
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes.

PAR M. H. VINCENT

Médecin-major de deuxième classe, professeur agrégé au Val-de-Grâce.

(Travail du laboratoire de bactériologie du Val-de-Grâce.)

De toutes les propriétés que possèdent les microbes pathogènes, la virulence est, peut-être, la plus instable, car elle est étroitement subordonnée aux conditions de nutrition et aux influences physico-chimiques ambiantes, si variables, auxquelles ces microbes sont soumis. On en trouve la preuve dans l'histoire de beaucoup d'infections, en particulier de la maladie charbonneuse, dont le bacille peut passer de la virulence la plus redoutable à la virulence la plus faible, et récupérer, inversement, son activité première par des passages successifs chez des animaux de plus en plus résistants.

En se fondant sur de pareils faits, il est permis de se demander s'il ne serait pas possible de soumettre les microbes saprophytes à une éducation progressive, capable de leur permettre de vivre dans un milieu jusqu'alors hostile, le milieu vivant. En d'autres termes, ne pourrait-on pas les transformer en microbes pathogènes et créer artificiellement, avec leur aide, des maladies expérimentales analogues à celles que provoquent les agents infectieux usuels ?

Quoique souvent posé, le problème n'a été qu'imparfaitement résolu, parce que, lorsqu'on essaie de réaliser expérimentalement de telles infections, on est arrêté par des obstacles véritablement considérables. Les moyens habituels (association de microbes favorisants, affaiblissement préalable de l'animal

infecté, traumatisme de la région inoculée, injection de doses élevées de culture, etc.) échouent devant la répugnance du saprophyte à se développer dans les tissus vivants. On obtient, parfois, la mort des animaux, à la condition d'employer des doses massives, qui tuent l'animal à la fois par leur volume et par les poisons préexistant dans la culture; mais ce résultat ne s'accompagne d'aucune multiplication locale ou générale du microbe inoculé. Or, un microbe ne peut être considéré comme pathogène que s'il possède la propriété de se multiplier *in vivo* et d'élaborer sur place des toxines dangereuses. C'est donc ce double attribut que l'on doit se proposer de donner au microbe saprophyte, et la difficulté en est grande.

Dans des tentatives qui remontent à plusieurs années, j'avais essayé vainement de produire une maladie expérimentale par l'inoculation du *B. subtilis* à de très jeunes animaux, ou par l'association de ce microbe à d'autres bactéries. Dans un autre essai, le bacille avait été cultivé dans du bouillon additionné de sang de lapin; il s'y développait, d'ailleurs, médiocrement. Le résultat fut peu démonstratif.

Il est donc important de mentionner ici les recherches de M. Charrin en collaboration avec M. de Nittis¹. Ce savant a réussi à obtenir la mort du cobaye en se servant d'un *B. subtilis* rendu virulent par passages successifs chez l'animal, ou par culture dans du bouillon de plus en plus riche en sang ou sur des milieux artificiels de plus en plus riches en poisons diastatiques, comme la toxine diphtérique. Au point inoculé, il se développait un œdème renfermant des bacilles abondants. Toutefois, il semble que la généralisation du microbe n'ait pas été constante, car les auteurs font remarquer que les organes étaient « le plus souvent » envahis.

Du reste, le *B. subtilis* se développe parfois assez mal, même *in vitro*, dans les milieux organiques. Le sérum normal,ensemencé avec des spores de ce microbe, peut même le tuer en quelques heures ou quelques jours².

Dans le même ordre d'idées, M. H. Roger ayant injecté sous la peau d'un cobaye un peu de liquide de macération de viande

1. CHARRIN et DE NITTIS, Un *Bac. subtilis* pathogène (*Soc. de Biologie*, 17 juillet 1897).

2. *Conf.* LECLEF, *La Cellule*, X, p. 349-375, 1894, et HALBAN, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, n° 7, p. 447, 1898.

putréfiée, l'animal succomba. Son sang renfermait un microcoque inoculable en série seulement sur un deuxième cobaye. La virulence de ce microbe n'avait donc été que transitoire.

Toutes ces expériences démontrent que les moyens habituellement employés pour renforcer l'activité des microbes pathogènes affaiblis ne sont pas aussi favorables lorsqu'on essaie de les appliquer aux saprophytes. C'est pourquoi il a paru nécessaire d'utiliser un autre procédé qui permit plus aisément l'acclimatement graduel de ces derniers à l'organisme animal.

Dans ce but, je me suis adressé à la méthode de M. Roux, qui consiste à cultiver les bactéries dans des sacs de collodion introduits dans le péritoine des animaux. Par son passage dans l'organisme vivant, et grâce aux échanges qui s'établissent à travers la paroi mince de collodion, le microbe, protégé contre les leucocytes, s'habitue à vivre en présence de leurs produits bactéricides dialysés, et à emprunter aux humeurs une partie de ses matériaux nutritifs. C'est ce procédé qui m'a fourni les résultats les plus efficaces.

Les expériences ont été faites avec deux microbes saprophytes incontestablement classés parmi les microbes inoffensifs : le *Bac. megaterium* et le *Bac. mesentericus vulgatus* (bacille de la pomme de terre). Au préalable on a, du reste, inoculé aux animaux des doses massives d'épreuve, sans éveiller autre chose qu'une réaction passagère de la température.

Les cultures en sac ont été faites avec le bouillon ordinaire. Lorsque, après une série de passages en sacs, ces cultures sont devenues plus riches et plus vivaces, les microbes ont étéensemencés dans du bouillon additionné de 1/3 de sérum. Chaque sac était retiré le 6^e-7^e jour ; son contenu était réensemencé et mis à l'étuve avant d'être soumis à un nouveau passage en sac.

Il importe de dire que la culture en sac des deux microbes, mais principalement du *Bac. mesentericus*, a été, primitivement, très difficile à obtenir. Le contenu des premiers sacs, à peine opalescent, ne renfermait que quelques bacilles et beaucoup de spores. Après de nombreuses tentatives pour varier les modes et les conditions de la culture en sac, en particulier l'injection quotidienne d'oxygène dans le péritoine des animaux, il a été constaté que le meilleur moyen d'obtenir une végétation abon-

dante des deux bacilles consistait dans l'usage de sacs à parois assez épaisses, qui protègent mieux les bactéries contre l'action des humeurs et des sécrétions leucocytaires. Avant d'être réparti et scellé dans les sacs de collodion, le bouillonensemencé était fortement agité et, d'autre part, on prenait soin de ne pas emplir entièrement les sacs de premier passage, afin de ménager un espace contenant un peu d'oxygène qui facilitât initialement la prolifération de ces microbes essentiellement aérobies.

Étudions maintenant les résultats particuliers obtenus avec chacun d'eux.

EXPÉRIENCES FAITES AVEC LE « B. MEGATERIUM »

Le *B. megaterium* est un saprophyte très commun dans le sol. L'échantillon qui m'a servi a été isolé de la terre de jardin. Ce microbe est inoffensif pour le lapin, le cobaye et la souris blanche; cette dernière peut recevoir 1 c. c. de culture sans en éprouver de dommage.

Un premier sac est fait le 17 avril 1897, et inséré dans le péritoine d'un cobaye; il en est retiré le 24 avril. Le contenu est faiblement trouble. On trouve, au microscope, des bacilles légèrement agglutinés, immobiles, sans spores. La deuxième culture en sac était plus trouble que la précédente. Ni l'une ni l'autre ne se montra encore pathogène.

Après quatre passages en sac, interrompus, chaque fois, par la culture en bouillon et à l'étuve, le bacille avait déjà acquis de la virulence. Quinze gouttes, additionnées d'un peu de bouillon neuf, tuent la souris en moins de 24 heures, en injection sous-cutanée. A l'autopsie, on trouve, au point inoculé, un peu de liquide d'œdème de couleur jaune clair, renfermant quelques bacilles et de très rares lymphocytes. Les préparations faites avec l'enduit péritonéal montrent également quelques bacilles prenant bien la coloration. Dans la rate et le foie, les bacilles sont cependant vacuolaires et se teintent à peine par le Gram. Les poumons sont vivement congestionnés, parsemés de petits foyers de pneumonie. Le sang du cœur renferme des bacilles dégénérés. Le microbe, quoique déjà un peu virulent, était donc, néanmoins, atteint lui-même dans sa vitalité.

Ainsi exalté par cultures successives en sac, le bacille finit, cependant, par acquérir, après le sixième passage, une virulence considérable. Quatre gouttes et même, dans un cas, deux gouttes injectées sous la peau tuaient la souris en 10-20 heures, avec des lésions de *péricardite* et de *pleurésie hémorragiques*. Au microscope, le liquide épanché montrait de nombreux bacilles, parfaitement colorables. On apercevait de très rares lymphocytes intacts, et de nombreux leucocytes dégénérés, parfois même à peine reconnaissables, dont le noyau était fragmenté en un nombre infini de granulations irrégulières, éparses dans le protoplasme de la cellule. Nulle apparence de globules rouges, malgré l'aspect hématique de l'épanchement pleuro-péricardique. Il y avait donc, en même temps qu'une leucolyse intense, une dissolution de l'hémoglobine telle qu'on l'observe dans les septicémies hémorragiques. Le sang du cœur présentait l'aspect dissous ; le bacille y était abondant. L'abdomen était météorisé ; le foie, d'aspect lavé ; la rate, très tuméfiée, molle et noire. L'exsudat péritonéal renfermait de nombreux bacilles, sans trace de phagocytose.

Ce microbe, si actif pour la souris blanche, était également très redoutable pour le cobaye et pour le lapin : un demi c. c. tuait un cobaye de 450 gr. en 24 heures, après injection péritonéale ; en 2 ou 3 jours en injection sous-cutanée, avec envahissement des viscères et du sang. L'inoculation intraveineuse de la culture en sac amenait la mort, en 12 heures, d'un lapin pesant 1,850 gr., à la dose de un demi c. c. Un c. c. tuait un autre lapin en 8 heures. L'autopsie ne révélait qu'un peu de congestion des reins et des poumons, et du gonflement de la rate. Le sang contenait de nombreux bacilles.

On avait donc réussi à communiquer au *B. megaterium* des propriétés pathogènes très prononcées qui le rendaient capable d'agir avec la même activité redoutable que les virus les plus énergiques. Il tuait les animaux sans déterminer de lésion locale, presque sans altération apparente des viscères, avec la marche d'une septicémie suraiguë.

En même temps que le bacille acquérait de la virulence, on constatait un changement manifeste dans les caractères de ses cultures. A l'état normal, le *B. megaterium*, ensemencé dans le bouillon, y forme, à la surface, un voile assez épais bordé d'une

collerette. Le bouillon sous-jacent est presque clair et renferme quelques grumeaux, visibles quand on l'agite. Or, dès le quatrième passage en sac, notre bacille troublait abondamment et uniformément le bouillon, formait des ondes chatoyantes quand on agitait celui-ci, et ne sécrétait plus de voile ni de collerette à la surface. Il semblait s'être adapté aux nouvelles conditions d'anaérobiose relative réalisées par la culture dans les sacs de collodion. Nous allons constater, à propos du *B. mesentericus*, des modifications plus remarquables encore.

Les attributs pathogènes de la race du *B. megaterium* n'ont pu être conservés qu'à la condition de les entretenir par la culture en sac. Abandonné à lui-même et réensemencé à l'air, le microbe s'atténuait progressivement. Après 3 mois, le bacille avait perdu toute sa virulence, même pour la souris blanche. De pareilles défaillances dans leur virulence existent chez un grand nombre de bactéries pathogènes. Du reste, trois passages en sac restituèrent au bacille sa virulence antérieure.

Les cultures en sac sécrètent des toxines qui diffusent à travers la paroi du collodion, et amènent un empoisonnement lent et un amaigrissement marqué de l'animal. Si on lui laisse le sac, le cobaye peut mourir entre 20 et 30 jours. Un cobaye est mort au huitième jour.

La ressemblance parfaite qu'affecte la nouvelle race de *B. megaterium* avec les microbes pathogènes proprement dits, s'accuse encore dans la manière dont se comporte le microbe à l'égard du sérum des animaux. Prenons un bacille dont la virulence commence à se dessiner, et qui tue la souris blanche à la dose de 4 c. c. sous la peau. Cette dose, inoculée au lapin, détermine seulement une fièvre légère et éphémère. On injecte ainsi à ce lapin, à intervalles de 8 à 10 jours, des cultures de plus en plus actives du bacille.

Le sang de ce lapin est devenu assez rapidement capable d'agglutiner le *B. megaterium* à 1/40 et même 1/100. Cette propriété agglutinante n'a pas paru nettement transmise par l'hérité maternelle.

Lorsqu'on fait agir comparativement, sur le bacille originel et sur le bacille éduqué, un sérum agglutinant, le premier de ces microbes est plus sensible que le second à l'action du sérum. Tandis que le bacille initial s'est laissé agglutiner à 1/20, la

séro-réaction était beaucoup moins marquée à l'égard de son dérivé pathogène, et se manifestait seulement à 1/10.

Lorsque, au lieu d'inoculer le microbe virulent, on inocule seulement la culture initiale, le sérum de l'animal ainsi traité devient-il capable d'agglutiner? L'expérience montre que le pouvoir agglutinant est très faible (1/5 ou 1/6). L'action produite par le saprophyte n'est donc pas assez efficace pour influencer l'organisme et provoquer le phénomène de la séro-réaction. Cet animal fut, du reste, tué par l'inoculation intraveineuse de 4 c. c. du bacille virulent; la mort survint à la fin du 3^e jour; il n'avait donc pas davantage été immunisé par le microbe indifférent.

On peut, cependant, vacciner les animaux contre le Bac. Megaterium virulent en leur inoculant des cultures de plus en plus actives. Un lapin, ainsi traité, est devenu réfractaire à l'inoculation intraveineuse de 2 c. c. d'une culture à son maximum de virulence, dont 1/2 c. c. tuait un autre lapin en 12 heures.

Les expériences qui précèdent montrent qu'il est possible de transformer un saprophyte inoffensif en un microbe pathogène, et de réaliser avec lui une maladie expérimentale mortelle, parfois presque foudroyante. Il est également possible de donner à l'animal une immunité véritable, passagère ou durable, contre le microbe à virulence exaltée, en utilisant la méthode de vaccination que Pasteur a employée pour la vaccination charbonneuse. Des expériences bien connues de M. Chauveau sur la bactériémie du charbon¹, il semblait résulter que la propriété immunisante constituait un caractère fondamental qui permit de définir le microbe pathogène. Nous venons de voir que cette propriété appartient aussi aux microbes saprophytes. Cette constatation présente quelque importance, car elle renverse la dernière barrière qui sépare le microbe pathogène du saprophyte vulgaire.

La même démonstration découlera encore de l'étude du microbe suivant.

EXPÉRIENCES FAITES AVEC LE « BAC. MESENTERICUS VULGATUS »

Le *B. mesentericus vulg.* (bacille de la pomme de terre) qui m'a servi a été isolé d'une infusion de foin soumise à l'ébullition.

1. CHAUVEAU, *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 1882, 1883 et 1884.

On sait que ce microbe est l'un des plus répandus dans la nature, soit à la surface du sol, soit sur les plantes (Macé). Il possède des spores très résistantes et donne, sur les milieux nutritifs, des cultures assez analogues à celles du *Bac. subtilis*, dont il n'est peut-être qu'une simple variété. Ses cultures sont, cependant, plus plissées, plus florissantes, plus extensives, et le bacille n'a pas la mobilité du *B. subtilis*.

Le *B. mesentericus vulg.* est complètement inoffensif. On peut injecter au cobaye, au lapin, 6 à 8 c. c. de culture sous la peau ou dans la veine, sans éveiller autre chose qu'un peu de fièvre. La souris peut supporter sans dommage l'inoculation de 2 c. c. de culture.

J'ai éprouvé, au début, ainsi qu'il a été dit plus haut, de très grandes difficultés pour cultiver ce microbe dans les sacs de collodion. Il fallut le protéger contre l'influence des sécrétions péritonéales, en l'enfermant dans des sacs à parois un peu épaisses, et fournir un peu d'oxygène à ce microbe essentiellement aérobie, en agitant le bouillon, avant de l'ensemencer, et en laissant dans le sac un petit espace libre contenant de l'air. Dans ces conditions, les cultures devinrent bientôt abondantes.

Le premier animal qui succomba à l'inoculation du *B. mesentericus* cultivé en sac fut un cobaye de 330 grammes qui avait reçu, dans le péritoine, 4 c. c. du contenu du sac de 4^e passage. L'exsudat péritonéal montrait une abondante quantité de leucocytes polynucléaires bourrés de bacilles; il existait aussi de nombreux lymphocytes. On apercevait quelques bacilles libres, très rares, vacuolaires, à peine colorés. L'animal n'avait donc succombé que par suite de la grande quantité de culture qui lui avait été inoculée, mais il n'y avait pas d'infection véritable.

Cependant la culture du sang fut positive, et ce microbe devint le point de départ de la nouvelle race. Par des passages successifs en sac, la culture devint de plus en plus riche. Au 7^e passage, la culture était très trouble, presque laiteuse, tant elle était abondante. Certains sacs ont donné des cultures de consistance visqueuse. Les bacilles étaient enfermés dans une sorte de gangue muqueuse. Quelle que fût l'abondance de la culture, c'est plus particulièrement sur la paroi même du sac que les bacilles étaient nombreux. Ils étaient là en quantité prodigieuse, tapissant la face interne de la membrane dont la

paroi les séparait de la couenne leucocytaire qui enveloppait le sac. Peut-être cette localisation plus spéciale des bacilles s'explique-t-elle simplement par le besoin d'oxygène du microbe¹.

Le bacille extrait du 7^e passage tuait la souris blanche en moins de 12 heures, à la dose de huit gouttes mélangées à un peu de bouillon frais, et le cobaye en 48 heures, à la dose de $\frac{3}{4}$ de c. c. introduits dans le péritoine. Un lapin de 1,450 grammes ayant reçu dans l'abdomen 1 c. c. du contenu du sac succomba en 37 heures.

Le 8^e passage en sac fournit une culture un peu plus virulente encore. Elle tuait, en effet, la souris à la dose de cinq gouttes, et le cobaye de 400 grammes à la dose de $\frac{1}{2}$ c. c. dans le péritoine. Un lapin de 2,530 grammes mourut en 30 heures à la suite de l'injection intraveineuse de 1 c. c. de la même culture².

La culture sporulée, soumise au chauffage à 100°, puis recultivée en sac, n'avait rien perdu de sa virulence. Celle-ci n'était donc pas passagère, mais *elle s'était transmise par descendance*.

Les symptômes très particuliers provoqués par l'inoculation de ce bacille modifié méritent d'être décrits.

La souris, après inoculation, ne présente aucun trouble particulier pendant 2 ou 3 heures. Alors, elle devient somnolente, se hérisse et, quand elle se déplace, titube comme un animal ivre. Au bout de 6 ou 7 heures, cet état d'engourdissement s'est aggravé; le train postérieur semble parésié. Le lendemain, si la dose inoculée n'a pas été trop forte pour tuer prématurément la souris, on trouve celle-ci, tantôt sur ses pattes, tantôt couchée sur le flanc, dans un état de stupeur absolue.

1. Peut-être aussi (mais ce n'est là qu'une hypothèse), les leucocytes, attirés par les sécrétions bactériennes à la superficie du sac, sécrètent-ils, à leur tour, par une influence chimiotactique réciproque, des substances capables d'attirer les bacilles.

2. Dans les cultures successives en sac, il y a parfois, d'un sac à un autre, et sans qu'on puisse en donner une explication plausible, une perte brusque de la virulence, en même temps qu'une diminution de la vitalité du bacille. A plusieurs reprises, sans cause appréciable, la culture en sac, jusque-là très abondante, était devenue tout à coup très maigre et avait perdu tout pouvoir pathogène. C'est seulement après plusieurs nouvelles tentatives que le bacille reprend de nouveau son caractère luxuriant et sa virulence.

Abandonné à lui-même et à l'air, le bacille perd progressivement sa virulence.

Les yeux sont clos; les mouvements respiratoires sont à peine apparents. Lorsqu'on pique la souris, elle se débat faiblement. Certaines souris sont restées pendant 24 heures, dans cet état comateux, puis ont succombé. Le coma est quelquefois interrompu par des accès de contractions toniques généralisées en opisthotonos, semblables à celles du tétanos.

Les phénomènes nerveux dont il vient d'être parlé sont toujours moins marqués chez le cobaye et chez le lapin. Cependant, on observe chez eux un peu de torpeur, une parésie plus ou moins marquée du train postérieur et un ralentissement des mouvements respiratoires. La température s'élève jusqu'à 40°, 40°,6, pendant quelques heures après l'inoculation. Puis elle s'abaisse dès que les troubles nerveux et les phénomènes d'intoxication apparaissent, et elle revient aux environs de la normale. Chez un cobaye, on a constaté de l'hypothermie (37°,2).

Les lésions d'autopsie varient un peu, suivant le siège de l'inoculation. Lorsque celle-ci a été pratiquée sous la peau, on trouve, à l'autopsie, un léger œdème sanguinolent renfermant des bacilles plus ou moins nombreux; aucune trace de phagocytose. La rate est un peu grosse; les reins sont injectés. Le sang renferme des bacilles intacts, facilement colorables. Lorsque l'injection est pratiquée dans le péritoine, on trouve, dans l'abdomen, un peu de liquide trouble, légèrement visqueux. Les bacilles sont abondants, libres; quelques-uns présentent le phénomène de Pfeiffer. La pulpe splénique, le sang, contiennent des bacilles. Enfin, l'injection faite dans la veine du lapin tue celui-ci sans déterminer de lésions, sauf, parfois, de petits foyers broncho-pneumoniques et une vive congestion des reins. Le foie est de consistance molle.

On peut déterminer une pullulation extraordinairement abondante du bacille, dans les organes, en injectant simultanément un peu de culture stérilisée du bacille pyocyanique ou du *B. Coli*.

Les phénomènes morbides et les lésions déterminées, chez les animaux, par le bacille virulent, démontrent que celui-ci tue non seulement par les toxines existant déjà dans sa culture, mais encore par une véritable infection. Les bacilles sont abondants, bien colorés, nullement dégénérés, dans tous les viscères et dans le sang. Ce microbe sécrète une toxine particulièrement

active, et le mode de culture en sac, par la méthode de M. Roux, semble exceptionnellement favorable à la production de ces poisons. L'inoculation des cultures faites *in vitro* donne lieu, en effet, à des symptômes analogues; mais ils sont beaucoup moins marqués, et il est nécessaire d'injecter une dose trois fois plus forte pour amener la mort des animaux.

La production de toxines très actives, sécrétées dans les conditions précitées, ressortira encore de ce fait que quelques-uns des cobayes à qui on insère des sacs succombent pendant la deuxième ou la troisième semaine, sans autre lésion qu'une forte congestion péritonéale et sans qu'il y ait eu passage du microbe hors du sac.

D'autre part, si l'on filtre le contenu d'un sac et qu'on injecte à un animal le liquide filtré, on détermine des symptômes de torpeur ainsi que la mort. Toutefois, la bougie de porcelaine arrête une grande partie des toxines.

La toxine chauffée à 65° perd toute son activité.

Suivant l'exemple fourni par les importantes recherches de MM. Roux et Borrel sur l'influence directe des poisons sur le système nerveux central, j'ai expérimenté l'action de la toxine en injection dans le cerveau des animaux. Dans ces conditions, le cobaye meurt, en moins de 24 heures, dans le coma, à la suite de l'injection intra-cérébrale de 1/200 de centimètre cube de culture du *B. mesentericus* modifié. Un lapin, à qui on a injecté une goutte de culture dans le cerveau, succombe dans le coma absolu en 24 ou 30 heures. Un lapin a cependant survécu à cette dose, après être resté longtemps très malade.

Le *B. mesentericus* modifié fabrique donc un poison très énergique du système nerveux.

Le phénomène de l'agglutination peut être constaté aisément, en traitant le bacille par le sérum d'un animal ayant reçu, à divers intervalles, des cultures de plus en plus actives. Un de nos cobayes agglutinait à 1/15; un lapin à 1/20.

*
* *

Parallèlement à ces modifications si importantes de ses propriétés biologiques, le bacille de la pomme de terre a offert, dans ses caractères sur les milieux de culture, des changements

singuliers qui fournissent encore une preuve bien remarquable de la plasticité des infiniment petits.

Cultivé dans le bouillon, le bacille normal, tel qu'il existe dans la nature, témoigne de son extrême avidité pour l'oxygène par la production précoce d'un voile dense, cohérent, qui se plisse et s'étend même sur les parois du tube. Il ne trouble pas le bouillon; le voile qui s'est formé peut tomber spontanément ou sous l'influence de l'agitation, et les bactéries ainsi noyées forment rapidement des germes. Un autre voile succède rapidement au premier. — La pomme de terre ensemencée est, de même, rapidement envahie sur toutes ses faces.

Ces caractères décrits comme classiques, la nouvelle race de *B. mesentericus* ne tarde pas à les perdre. Au lieu du voile épais, surnageant à la surface du bouillon resté clair, le nouveau bacille commence par troubler abondamment et uniformément le milieu. Après 2 jours, on voit apparaître une pellicule mince et fragile qui se dissocie avec la plus grande facilité, et qui est lentement remplacée par un autre voile aussi délicat. La culture est visqueuse. Examinée après quinze jours, elle est remarquablement pauvre en spores.

Ensemencé à la surface de la gélose, le bacille modifié ne s'étend pas au delà de la ligne d'ensemencement. Au lieu de cette membrane touffue et plissée qui recouvre la totalité du milieu nutritif, on obtient une strie opalescente, presque transparente, qui rappelle entièrement celle du bacille d'Eberth. La ressemblance est encore plus singulière sur la pomme de terre, où le bacille donne une traînée mince, humide, luisante, exclusivement limitée à la strie d'ensemencement. Par ses nouveaux caractères botaniques, le bacille différerait donc entièrement de son ancêtre, et j'eusse moi-même hésité à reconnaître, à ce moment, le bacille vulgaire de la pomme de terre, si je ne l'avais suivi dans son développement. Il fallut ensemencer *in vitro* le bacille dans du bouillon, et le cultiver à l'étuve pendant quatre ou cinq générations pour voir ce microbe reprendre progressivement et rigoureusement tous ses caractères primitifs, comme on voit une plante cultivée revenir peu à peu et spontanément à son type sauvage, si elle n'est plus soumise aux conditions de culture qui avaient réussi à la modifier.

Cet ensemble montre combien il faut faire peu de fonds sur

la fixité des caractères morphologiques et des réactions de culture des Schizomycètes.

Il n'est pas jusqu'à l'un de ses attributs les plus importants et, en apparence, les plus immuables, à savoir son caractère strictement et essentiellement aérobie, dont notre bacille ne puisse, dans une certaine mesure, se dépouiller à son tour. Malgré son avidité pour l'oxygène, le microbe s'est lentement habitué à vivre dans l'abdomen des animaux, dans des conditions d'oxygénation beaucoup moins favorables. Si, avant de fermer la culture en sac et de la mettre dans le péritoine, on additionne le milieu d'un peu de sulfoindigotate de soude, et qu'on retire le sac déjà après 48 heures, on constate que l'indigo a été totalement réduit. Les cultures en sac dégagent une odeur particulière, caséeuse, analogue à celle des anaérobies, et que n'ont pas les cultures faites à l'air libre. Il y a plus : en cultivant *in vitro* et dans le vide fourni par la pompe à mercure le bacille retiré du sac, on s'aperçoit qu'il s'y développe, quoique très faiblement, alors qu'un échantillon témoin primitif ne donne lieu à aucune culture. Le bacille modifié trouble le bouillon, dans ces nouvelles conditions, et réduit l'indigo. La culture anaérobie, examinée au microscope, montre des bacilles normaux, sans spores, sans formes d'involution. *Il y a donc eu véritablement culture dans le vide d'un microbe exclusivement aérobie.* Ces essais ont été poursuivis; mais, à la deuxième génération, la culture était devenue beaucoup plus faible, et la troisième génération fut nulle.

*
* *

Si nous avons à conclure de ces recherches, nous dirions qu'il ne paraît plus possible d'admettre, comme rigoureusement fondée, la classification, acceptée pendant longtemps, des bactéries, suivant qu'elles se développent chez l'être vivant ou qu'elles se refusent à vivre ailleurs que sur la matière morte. Cette distinction est artificielle, autant que l'est la notion, si discutable, de la fixité des fonctions et de la morphologie des microbes. Telle est leur flexibilité qu'ils sont capables de s'élever par degrés, de leur état saprophytique banal, à la dignité d'agents pathogènes. Malgré la tendance qu'ils ont à recouvrer leurs caractères héréditaires¹, les microbes s'accommodent donc, parfois avec facilité, aux nou-

1. DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. I, p. 235.

velles conditions d'existence qui leur sont imposées. Ils peuvent ainsi acquérir, plus ou moins laborieusement, la faculté de fabriquer des substances diastatiques toxiques grâce auxquelles ils digèrent et tuent la cellule vivante pour se multiplier sur ses ruines : ils sont devenus virulents. Cette adaptation à la vie parasitaire dans le milieu vivant n'est, elle-même, qu'un attribut contingent et instable au même titre que les autres propriétés du microbe.

De pareils faits éclairent singulièrement la question, encore bien obscure et bien discutée, de la spontanéité morbide. Ils permettent, sans doute aussi, d'expliquer le retour de certaines épidémies, depuis longtemps disparues, dont le germe peut rencontrer, chez certains animaux inférieurs, un terrain propice au réveil de leur virulence. Tel est le cas pour le bacille de la peste et, vraisemblablement, pour d'autres virus encore. Qu'un microbe, jusqu'alors inoffensif, se trouve, de même, dans des conditions qui lui permettent de se développer chez un premier animal réceptif ; si le hasard lui offre la série des passages que nous réalisons expérimentalement dans nos laboratoires, le saprophyte deviendra pathogène. Ainsi sera née une nouvelle maladie infectieuse. C'est l'hypothèse que MM. Pasteur, Chamberland et Roux ont soulevée, il y a longtemps, dans une note mémorable¹ sur l'atténuation des virus et sur leur retour à la virulence. Les expériences qui précèdent semblent venir à leur appui.

1. *Acad. des Sc.*, 25 février 1884.

ÉTUDE CYTOLOGIQUE ET CYCLE ÉVOLUTIF

DE LA COCCIDIE DE LA SEICHE

PAR MICHEL SIEDLECKI

I

HISTORIQUE

La Coccidie dont nous nous occupons dans ce mémoire paraît avoir été vue pour la première fois, en 1862, par Eberth. Aimé Schneider, en 1875 (*Arch. zool. exper.*), trouva chez les *Octopus vulgaris* de Roscoff une psorospermie, à laquelle il donna le nom de *Benedenia octopiana*, caractérisée par des kystes renfermant de nombreux sporocystes (*au sens de Léger*) avec une quinzaine de sporozoïtes dans chaque sporocyste; la description, très courte, est accompagnée de quelques figures dans le texte. — En 1883 (*Arch. zool. exper.*), le même savant décrit longuement l'évolution d'une Coccidie de la seiche qu'il ne distingue pas spécifiquement de celle du poulpe, et qui aurait seulement 3, ou rarement 4 sporozoïtes par sporocyste (c'est cette forme que nous avons eue sous les yeux). Dans une note au bas de la page 101, Schneider remarque lui-même qu'il avait noté 8—15 sporozoïtes par sporocyste chez la Coccidie du poulpe vue à Roscoff; il ajoute qu'on peut se tromper en appréciant le nombre des sporozoïtes quand on les compte par transparence à travers la paroi du sporocyste; et il ne conclut rien. Schneider s'est-il réellement trompé? La chose est fort possible; sa Coccidie avec 15 sporozoïtes par sporocyste ne paraît pas avoir été retrouvée; Mingazzini (*Atti della reale Acad. dei Lincei*, 1892, I) déclare, en revanche, avoir trouvé la même espèce de Coccidie chez *Sepia officinalis* et chez *Octopus vulgaris*, et c'est celle à 3 ou 4 sporozoïtes par sporocyste.

Ces considérations nous ont engagé à ne pas nous montrer plus rigoriste que Schneider lui-même dans les distinctions spécifiques et à appeler comme lui : *Klossia octopiana*, la Coccidie de

la seiche. Mais il est bien entendu que si l'avenir prouve la parfaite exactitude de ses observations de 1875, le nom de *Klossia Eberthi*, proposé par Labbé pour la *Klossia* de la seiche, devra être adopté.

On remarquera que Schneider, en 1883, a adopté le nom générique *Klossia* créé pour la Coccidie de l'*Helix*; Labbé et Léger ont été du même avis. Au contraire, Mingazzini a conservé le nom générique *Benedenia*. Provisoirement, nous adoptons le nom *Klossia*; car il n'y a pas, à l'heure actuelle, de raison suffisante pour séparer génériquement les Coccidies de l'*Helix* et des *Céphalopodes*; mais les premières sont trop mal connues (l'on ne sait à peu près rien sur leur évolution avant l'enkystement) pour que notre manière de voir puisse être regardée comme définitive. Aux savants qui s'occuperont de *Klossia helicina* de décider si elle est génériquement distincte ou non de celle des céphalopodes¹.

Labbé², dans son travail d'ensemble sur les Coccidies, donne une bibliographie très complète à laquelle nous renvoyons. Signalons simplement le travail de Schuberg³, de 1895, sur la Coccidie de la souris, que Labbé ne signale pas dans son index, et les travaux de Simond⁴, Schaudinn et Siedlecki⁵, Léger⁶, postérieurs au mémoire de Labbé.

Le présent travail a été fait, partie à la station zoologique de Naples (janvier-mai 1897) et partie à l'Institut Pasteur de Paris (1898). Nous tenons ici à exprimer notre vive reconnaissance aux professeurs Dohrn et Metchnikoff. M. Dohrn a eu la générosité de nous offrir une place à sa célèbre station, où nous avons eu une grande abondance de matériaux à notre disposition; M. Metchnikoff nous a reçu très cordialement dans son laboratoire et nous a fait profiter de ses conseils si autorisés.

1. Ces lignes étaient à l'impression quand nous avons pris connaissance de la note de M. Laveran (*C. R. Soc. Biologie*, séance du 26 nov. 1898), sur l'évolution de la *Klossia helicina*; elle diffère tellement de celle de la Coccidie de la seiche, que nous pensons que les deux organismes doivent être séparés génériquement, et qu'on doit revenir à l'ancien nom de Schneider, *Benedenia octopiana*.

2. LABBÉ A, Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur les Coccidies. — *Arch. zool. exp.*, 3^e série, t. IV, 1896.

3. SCHUBERG, Die Coccidien aus dem Darm der Maus. *Verhandl. d. nat. hist. med. Vereins Heidelberg*, n. folge, V., 4 Ht, 1895.

4. SIMOND, L'évolution des Sporozoaires du genre *Coccidium*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897, t. XI.

5. SCHAUDINN et SIEDLECKI, Beiträge zur Kenntniss der Coccidien. — *Verhandl. der deutsch. zool. Gesels.*, 1897.

6. LÉGER L, Essai sur la classification des Coccidies et description de quelques espèces nouvelles ou peu connues. — *Bull. du Muséum de Marseille*, t. I, fasc. I, 1898.

Un court résumé de notre mémoire a déjà été publié dans les *Comptes rendus de la Société de Biologie* (séance du 15 mai 1898).

II

TECHNIQUE

Les seiches qui nous ont servi pour nos recherches ont été pêchées dans le golfe de Naples¹, et elles ont été disséquées à l'état vivant. Parfois, nous laissions les animaux séjourner un ou plusieurs jours dans les aquariums de laboratoire de la station zoologique ; mais leurs parasites, observés au bout de ce temps, nous ont toujours paru identiques avec ceux retirés des animaux sacrifiés immédiatement après la pêche.

Toutes les seiches que nous avons examinées étaient infectées plus ou moins fortement. Les parasites étaient localisés à l'appareil digestif². L'infection était reconnaissable à l'œil nu, car la partie postérieure de l'intestin portait des points blancs opaques (kystes de grandes dimensions).

Nous avons fait nos observations sur le frais et aussi sur des préparations fixées et colorées. Pour opérer sur le frais, nous nous servions de lamelles très minces, dont nous fondions très légèrement les 4 angles à la flamme d'un bec Bunsen ; la lamelle était ainsi munie de 4 petits pieds qui empêchaient l'écrasement des objets à examiner. Sur une lamelle ainsi préparée, nous déposions, dans une goutte d'eau de mer ou de liquide intestinal, une petite quantité d'épithélium intestinal, que nous fragmentions autant qu'il était possible. La lamelle était alors retournée et placée sur un porte-objet.

Les préparations colorées ont été faites avec des frottis ou bien avec des pièces débitées en coupes. C'est la première méthode qui nous a donné les meilleurs résultats ; son emploi est d'une importance capitale pour l'étude des Coccidies ; aussi allons-nous la décrire avec quelques détails.

Nous plaçons sur une lamelle, dans une goutte d'eau de mer ou de suc intestinal, un fragment de la paroi intestinale de 5 à

1. Nous avons étudié aussi quelques seiches qui nous ont été envoyées, fixées au formol, par la Société scientifique d'Arcachon ; nous n'avons observé, dans l'étude des parasites, aucune différence avec celles de Naples.

2. Une fois seulement, nous avons trouvé des kystes mûrs dans le manteau d'une seiche.

10 millimètres carrés. Avec des aiguilles fines, nous enlevons les couches muqueuse et sous-muqueuse; la couche épithéliale et le tissu conjonctif sous-jacent, qui renferment les divers stades de l'évolution du parasite, sont alors dilacérés avec soin et répartis d'une façon aussi uniforme que possible sur toute la surface de la lamelle. La lamelle ainsi préparée est retournée et déposée à la surface du liquide fixateur contenu dans un verre de montre. La couche qui recouvre la lamelle est rapidement coagulée et en même temps lui est assez solidement collée pour qu'elle puisse ensuite passer par les divers liquides nécessaires sans abandonner aucun fragment des tissus qu'on y a déposés. La goutte d'eau ou de suc intestinal qu'on met sur la lamelle au commencement de l'opération doit être juste suffisante pour empêcher le dessèchement des tissus étalés avant leur fixation (la structure des Coccidies est profondément modifiée quand ces organismes ont été desséchés avant d'être fixés; il faut donc éviter avec un soin tout particulier cette grave cause d'erreur). Si le liquide est en trop grande quantité, la coagulation par le fixateur est insuffisante; le collage sur la lamelle se fait mal et on perd ainsi une partie des tissus déposés ¹.

Comme fixateur, nous avons surtout employé la solution concentrée de sublimé dans l'eau de mer, additionnée de 3 à 5 gouttes d'acide acétique cristallisable pour 100 c. c.; la fixation est toujours excellente et les tissus peuvent ensuite prendre presque tous les colorants. — Les liquides de Flemming et d'Hermann donnent également de bons résultats, en particulier pour les pièces qui doivent être coupées. Le liquide de Perenyi, le mélange de sublimé, en solution, avec de l'acide nitrique à 3 0/0, donnent des résultats inférieurs à ceux des précédents fixateurs.

Les frottis, après fixation par le sublimé ou les liquides osmiques, sont lavés à l'eau, puis portés dans les alcools de concentration croissante (30°, 50°, 70°, 96°), jusqu'à l'alcool absolu où on les laisse de 1/2 heure à 1 heure; on revient ensuite peu à peu à l'alcool à 50°.

Les tissus sont alors prêts à être colorés. — La lamelle doit

1. Le principe de cette méthode, que nous avons précédemment employée avec Schaudinn, est indiqué par R. Pfeiffer, dans son travail sur la coccidiose des lapins.

séjourner de 1/2 heure à 1 heure dans le liquide fixateur, de 10 à 30 minutes dans chaque alcool (sauf l'alcool absolu). Si le fixateur est un liquide osmique, le lavage à l'eau doit durer au moins 4 heures, à l'obscurité autant que possible, en ayant soin de changer l'eau plusieurs fois. Après la fixation au sublimé, il convient de mettre de l'iode dans l'alcool à 70 ou à 96°.

Pour colorer aussi bien les frottis que les coupes, nous avons obtenu d'excellents résultats en employant l'hématoxyline de Böhmer, en dilution très étendue dans l'eau distillée. Les préparations séjournaient de 12 à 24 heures dans le colorant; puis étaient différenciées par l'alcool à 50° additionné de traces d'acide chlorhydrique. La couleur passe un peu au rouge; mais on revient au bleu violacé en lavant avec l'alcool à 50° légèrement ammoniacal. Cette méthode met en évidence toutes les finesses de structure des noyaux.

Pour certains détails, il est bon d'employer (et nous l'avons fait souvent, surtout pour les coupes) la méthode de coloration de M. Heidenhain (hématoxyline à l'alun de fer).

Ces colorants donnent également une idée assez nette de la structure du cytoplasme; mais on a de meilleurs résultats en faisant une seconde coloration avec l'éosine soit seule, soit additionnée d'orange G. Nous employions ces substances en solution aqueuse très faible; la préparation devait y séjourner de 3 à 12 heures.

Pour les pièces fixées au Flemming, c'est toujours la safranine qui donne les meilleures colorations.

III

STADE ADULTE INDIFFÉRENCIÉ DE LA COCCIDIE

Nous désignons ainsi un état de la Coccidie qui, après être partie du stade de *sporozoïte*, s'est accrue et a accumulé ses matières de réserve, mais ne se prépare pas encore à la reproduction.

A ce stade, la *Klossia octopiana* est une cellule ovale, avec des contours toujours bien réguliers (fig. 3); souvent la différence de longueur des axes de l'ellipsoïde est si faible que la Coccidie semble sphérique.

Les individus jeunes sont beaucoup plus allongés et peuvent

même avoir la forme d'un fuseau tout droit (fig. 1) ou légèrement arqué (fig. 2).

Avec la forme, les dimensions de la Coccidie *adulte* varient aussi dans des limites assez étendues; en moyenne (c'est le cas de la fig. 3), le grand axe a de 48 à 52 μ , le petit a de 40 à 45 μ . Mais on rencontre très fréquemment des individus énormes, presque sphériques, d'un diamètre de 150 à 170 μ .

La *Klossia* adulte est une cellule *nue*. Elle ne présente aucune membrane de structure appréciable. A. Schneider dessine une membrane assez épaisse autour de la cellule; mais le stade représenté correspond sans doute à un état plus avancé que celui de notre figure 3. Labbé, en parlant de la structure du protoplasma des Coccidies en général, fait mention d'une fine membrane à la surface des parasites adultes. Jamais nous n'avons pu constater la présence d'une semblable enveloppe ni chez la *Klossia* de la seiche, ni les Coccidies des *Lithobius* et des tritons; Simond partage entièrement notre manière de voir. — Les contours, toujours si réguliers des Coccidies, s'expliquent fort bien par une plus forte réfringence et une différence dans la structure du protoplasme de la Coccidie, comparé à celui de la cellule hôte. — Comme nous le verrons plus loin, un certain nombre de faits bien observés (Ex. : pénétration d'un microgamète) seraient inexplicables si le parasite était entouré d'une membrane. Tout au plus pouvons-nous admettre que le protoplasme est particulièrement condensé à la périphérie de la cellule.

Le protoplasme a une structure bien caractéristique. A la périphérie de la cellule, comme nous venons de le dire, et aussi autour du noyau, il est un peu plus condensé. Ces deux zones sont reliées par une couche intermédiaire extrêmement vacuolaire; le protoplasme dessine dans tout cet espace un réseau à grandes mailles. Les vacuoles sont à contenu clair qui se colore très faiblement par l'hématoxyline.

Chez les individus jeunes, les deux couches limites sont particulièrement nettes; elles arrivent au contact suivant l'équateur de l'ellipsoïde: il en résulte que cette zone se colore plus fortement que tout le reste de la Coccidie; c'est une disposition que nous avons également observée chez le *Coccidium Schneideri* du *Lithobius*.

La structure intime du protoplasme est donc alvéolaire; mais

les parois des alvéoles sont très épaisses et montrent bien les fins granules qui les composent. Ces granules n'appartiennent à aucune des catégories décrites par Thélohan dans le cytoplasme des Coccidies ; ce sont simplement des *microsomes*. Ils sont très réfringents, se colorent assez fortement par l'hématoxyline, de sorte que, après cette coloration, tout le protoplasme a une teinte bleuâtre. Si l'on fait ensuite une coloration à l'éosine, on a une teinte rouge violacé. — Dans les régions où le protoplasme est condensé, les granules occupent tout l'espace : il n'y a plus d'alvéoles, et la cellule a là un aspect granuleux uniforme.

Presque tous les savants qui ont étudié *Klossia octopiana* ont plus ou moins bien vu cette structure du cytoplasme, mais c'est seulement Mingazzini qui a noté la différenciation en deux zones. — La disposition spéciale du protoplasme en traînées radiales, entre lesquelles sont des vacuoles, rappelle un peu ce que l'on observe chez les cellules végétales. La ressemblance est surtout frappante avec les cellules de *Chara fragilis*, où M. Debski décrit une structure alvéolaire du protoplasma, les parois des alvéoles montrant un aspect granuleux.

Dans ces parois, chez les jeunes individus de *Klossia*, on remarque des granules arrondis plus gros que les autres, qui, à l'état frais, se distinguent à leur forte réfringence : ils ne sont solubles dans aucun des fixateurs employés ; ils se colorent distinctement par l'hématoxyline et le carmin aluné. Ils correspondent aux granules *chromatoïdes* de Thélohan ; il ne faut pas les confondre avec les granules de chromatine, d'origine nucléaire, que l'on trouve aussi dans les parois des alvéoles, mais seulement à certains stades de la division nucléaire que nous décrirons plus loin. La distinction est d'ailleurs très facile ; car on reconnaît que le noyau est en état de division à sa structure particulière. — En général, chez la Coccidie adulte, les granules chromatoïdes ne persistent pas.

Assez souvent, chez des *Klossia* très jeunes, nous avons observé, dans le cytoplasme, des granules que l'acide osmique noircit ; ce sont des globules de graisse ; on ne les rencontre chez des Coccidies plus développées que dans des cas de dégénérescence.

Quant aux granules plastiques qui, d'après Labbé, doivent se trouver chez la *Klossia de la Seiche*, « plusieurs... pâles... dans une même aréole cytoplasmique », nous ne les avons jamais

observés, malgré les différents modes de fixation et de coloration employés.

Ni chez les adultes ni chez les jeunes *Klossia*, nous n'avons vu de centrosomes. Labbé les dessine comme des corpuscules ronds, situés près du noyau, dans une vacuole, mais sans aucun arrangement du protoplasme autour. Nous sommes persuadé que Labbé interprète inexactement les corps qu'il dessine. Ce sont simplement des granules chromatoïdes, et il n'y a *aucune raison* de les considérer comme centrosomes.

Le *noyau*, toujours très bien visible, occupe le centre de la Coccidie. Il comprend une membrane, un réseau de chromatine et du suc nucléaire; au centre, est en suspension un gros corps, se colorant fortement et d'une structure très spéciale. Presque tous les savants qui ont étudié la *Klossia octopiana* caractérisent ainsi son noyau. Seul, Schneider n'a pas remarqué la présence du réseau de chromatine, sans doute parce qu'il se servait de méthodes de fixation et de coloration peu précises.

La membrane nucléaire, chez les individus adultes, est toujours nettement visible comme une couche très mince moulant les contours du noyau; elle se colore de la même façon que le réseau de chromatine; et, en fait, elle ne représente qu'une partie plus condensée de ce réseau. Quand on en prend une vue superficielle à de très forts grossissements (fig. D., p. 810), on constate qu'elle consiste en un réticulum de chromatine très condensée, avec des mailles très petites. Les petits filaments et bâtonnets de chromatine de ce réticulum restent toujours en communication avec ceux de l'intérieur du noyau. Labbé (p. 573) dit, en parlant de la membrane nucléaire de *Klossia Eberthi*, que « sur des coupes fines, elle paraît percée de pores », et, plus loin, « que, dans des coupes minces, il est difficile de voir la limitation exacte du noyau autrement que par la coloration des petits granules de chromatine... ». Cette description confirme notre manière de voir; les « pores » correspondent certainement à des mailles superficielles, et les « granules chromatiques » à des nœuds du réseau chromatique que nous avons décrit. Du reste, les recherches cytologiques ont établi que presque toutes les cellules ont une membrane nucléaire qui n'est autre chose qu'une condensation de chromatine à la surface du noyau; *Klossia* ne fait donc pas exception à la règle générale. — A l'extérieur du noyau et en

contact avec la pseudo-membrane nucléaire, se trouve le réseau chromatique. Il consiste en un amas de bâtonnets et de granules chromatiques, reliés entre eux par de fins filaments, prenant moins fortement les colorants basiques ; ils sont formés de linine.

Les portions les plus condensées de ce réseau renferment à leur intérieur des espaces plus clairs. Souvent la couche du réseau chromatique est très mince et adhère tellement à la surface du noyau qu'elle semble être simplement une partie moins condensée de la membrane. Vers le centre du noyau, le réseau est de moins en moins compact : mais des parties de chromatine très minces traversent le noyau en entier. En général, on peut dire que le réseau de chromatine est ainsi disposé que ses parties ont une tendance centrifuge.

Le réticulum chromatique est plongé entièrement dans le suc nucléaire qui remplit tous les espaces vides du noyau. Sur les préparations, ce suc apparaît comme une substance très finement granuleuse, qui se colore faiblement aussi bien par les couleurs basiques (hématoxyline) que par les couleurs acides (éosine). Nous en concluons que ce suc consiste dans le mélange de deux substances, l'une correspondant au karyoplasme des animaux supérieurs, l'autre à la chromatine, probablement à l'état de dissolution. Cette supposition est d'autant plus probable que, à divers stades du développement de la *Klossia* que nous décrirons plus loin, il se produit très nettement une dissolution de chromatine dans le suc nucléaire ; il est donc fort possible que, à un stade encore indifférencié, il se manifeste une sorte de prédisposition à cette dissolution. A l'intérieur du noyau, souvent même au centre, et toujours dans une région où le réseau chromatique est réduit à de très fins filaments traversant tout le noyau, on observe un gros corps rond, prenant fortement les couleurs basiques ; c'est un nucléole (Schneider, Mingazzini) d'une structure très spéciale. Labbé donne à ce corps le nom de *Karyosome*. Avec Schaudinn, nous avons appelé des corps semblables chez *Adelea ovata* et *Coccidium Schneideri*, « Binnenkörper » (au sens de Rhumbler). La structure et la fonction de cette partie du corps de la Coccidie semble être bien différente de celles des nucléoles vraies des cellules de métazoaires, et nous adoptons ici le nom de *Karyosome*, qui est bien pris au sens de E. Wilson dans son livre sur la cellule.

Le karyosome est toujours, dans une cellule adulte indifférenciée, sphérique. Il se colore souvent si fortement avec les substances basiques qu'il semble être de structure compacte et uniforme (fig. 3). Mais en employant des colorants très électifs, on voit qu'il se compose de deux parties. L'une corticale, épaisse, est très condensée et, observée à de très forts grossissements, montre une structure alvéolaire. Les alvéoles sont très petites, et les espaces qui les séparent sont relativement très épais, de sorte qu'un gonflement, même léger, provoqué par les réactifs, fait disparaître les alvéoles. Souvent, elles sont disposées si régulièrement qu'elles donnent l'apparence d'une striation radiaire, telle qu'elle a été décrite par Schneider. Cette zone corticale se colore très distinctement par les substances basiques, et elle existe toujours, quel que soit l'âge de la Coccidie, même chez les plus jeunes; de sorte que jamais son apparition n'indique une dégénérescence du karyosome, comme le veut Labbé. Cette couche corticale semble être la partie principale du karyosome; elle est formée de vraie chromatine ¹.

A l'intérieur de cette membrane, on trouve une substance granuleuse, très fine, qui se colore faiblement par l'hématoxyline, mais prend assez fortement les colorants acides; avec le picrocarmin, la membrane se colore en rouge, tandis que la substance intérieure reste jaune. Elle remplit toute la cavité du karyosome, à l'exception d'une vacuole grande et claire, située assez près de la périphérie. Vis-à-vis de cette vacuole, se trouve *toujours* une petite ouverture dans la paroi du karyosome. De cette ouverture, sort un mince pédoncule formé de la même substance granuleuse qui emplit le karyosome. A l'extrémité de ce pédoncule, est attaché un petit corps rond se colorant très fortement avec les couleurs basiques; c'est un karyosome secondaire. Souvent (fig. 3) le pédoncule est très court, et la petite sphère se trouve tout près de la surface de la grosse, parfois même dans un léger enfoncement de la membrane du karyosome principal.

Nous avons observé la présence du karyosome secondaire chez toutes les Klossia octopiana adultes, mais encore indifférenciées. Mais, pour cela, il est nécessaire que la coloration soit bien élective; car souvent, sur les préparations, la petite sphère est située soit

1. Cette constitution chimique différencie donc notre karyosome des nucléoles vraies qui ne renferment jamais de basichromatine.

au-dessus, soit au-dessous de la grosse et alors elle devient difficile à apercevoir. Dans les préparations faites par la méthode de Heidenhain (hématoxyline et alun de fer), on réussit à voir très bien le karyosome secondaire dans toutes les positions, car il prend la couleur noire beaucoup plus fortement que le gros, et on l'aperçoit comme une tache noire au-dessus ou au-dessous de la tache grise du karyosome primaire. La présence du karyosome secondaire est un *fait normal* et n'est en relation ni avec une dégénérescence ni même avec une transformation nucléaire quelconque, comme le prétend Labbé.

Chez les jeunes *Klossia*, on retrouve la même production, mais sous une forme un peu différente. Il nous a été possible de suivre, sur nos préparations, tous les stades du développement de la *Klossia* à partir de la pénétration du sporozoïte dans la cellule épithéliale de l'intestin, et nous avons constaté que toutes les parties du noyau et du karyosome que nous venons de décrire, ou existent depuis le début de l'évolution, ou se forment de parties déjà existantes, et cela à des périodes où il est impossible de parler de dégénérescence.

Une jeune *Klossia*, dès qu'elle a perdu les caractères d'un sporozoïte (fig. 1), se présente comme une cellule allongée avec un cytoplasme granuleux renfermant un grand nombre de vacuoles. Le noyau a conservé la forme sphérique qu'il avait dans le sporozoïte ; mais, en son centre, on aperçoit un gros karyosome, caractérisé par deux couches de colorabilité différente.

La chromatine n'a plus l'aspect compact qu'elle présentait chez les sporozoïtes (fig. 26), mais elle se dispose en un réseau très fin qui, du côté externe, constitue la membrane nucléaire, et dont les filaments vont, du côté interne, jusqu'au karyosome (stade de la fig. A). Un certain secteur du réseau annulaire est toujours reconnaissable par la présence d'un amas particulièrement dense de chromatine ; les contours de cet amas sont assez irréguliers ; il touche par son extrémité distale le karyosome (voir fig. A, à droite et en haut).

Au point de contact des deux corps, on ne distingue pas bien la membrane du karyosome, et il semble qu'une communication puisse se faire en ce point entre les deux masses.

Pendant l'accroissement du noyau, le réseau chromatique se

retire de plus en plus à la périphérie (fig. B) ; l'amas, à structure plus dense, prend une forme très régulière, celle d'un triangle appuyé par sa base contre la membrane nucléaire et dont le sommet touche la membrane du karyosome (fig. B).



La cellule s'accroissant de plus en plus, son noyau grandit, devient ovale ; le réseau de chromatine est presque exclusivement à la périphérie du noyau, et la communication entre l'amas polaire et le karyosome ne se fait plus que par un pédoncule mince et allongé. (Fig. C.)

Enfin, quand le noyau atteint presque son état adulte, le contact entre l'amas et la membrane nucléaire cesse ; on a une petite boule de chromatine très condensée reliée au karyosome par un mince pédoncule (fig. D) ; c'est le karyosome secondaire que nous avons décrit. Le pédoncule se raccourcit encore et nous avons le stade de la fig. 3.

Cette évolution prouve, d'une façon indiscutable, que la présence du karyosome secondaire est *normale* ; mais sa fonction est assez énigmatique. Nous pensons, d'après son développement et aussi d'après des faits que nous exposerons plus loin, qu'il joue un rôle d'intermédiaire entre la chromatine du réseau nucléaire périphérique et celle qui constitue la couche corticale du karyosome primaire. Durant l'accroissement de la cellule, il peut entrer ainsi une certaine quantité de chromatine dans le gros karyosome. Au moment de la division nucléaire, cette chromatine s'échappe en partie par le même chemin et sert à renforcer le réseau chromatique. C'est au voisinage du karyosome secondaire, en effet, que commencent tous les changements nucléaires qui se produisent au moment de la transformation de l'adulte indifférencié en individus sexués.

* x

Nous montrerons, dans les pages qui vont suivre, que la reproduction de la *Klossia* est précédée d'un phénomène sexué. Ici, nous voulons insister sur ce point que nous avons vainement cherché une multiplication endogène, correspondant aux *stades éimériens* ou à *kystozoïtes* de Léger, aux stades à *mérozoïtes* de Simond, ou à ce que Schaudinn et nous avons appelé stade à *macrogamètes*. Chez la *Klossia* de la Seiche, une pareille multiplication n'existe pas, et le macrogamète, c'est-à-dire la cellule femelle, celle qui reçoit l'élément mâle, le microgamète, est simplement le produit de l'accroissement, *sans multiplication*, d'un sporozoïte sorti d'un sporocyste. Ce cas est unique jusqu'ici chez les Coccidies ; aussi tenons-nous à le mettre en relief.

Malgré cela, l'auto-infection peut fort bien se produire, mais par un mécanisme particulier que nous décrirons plus loin. Disons ici qu'elle n'a pas lieu par une division en deux comme le prétend Labbé. Nous sommes convaincu, d'après l'examen de nos préparations, qu'un pareil mode de multiplication n'existe ni chez *Klossia octopiana*, ni chez *Adelea ovata* Schn., ni chez *Coccidium Schneideri* (*Eimeria Schneideri* Bütsch.) et *C. proprium* Schn. Les figures que donne Labbé correspondent à des stades qui suivent la fécondation¹. La présence de deux Coccidies dans une même cellule hôte s'explique fort naturellement par une infection multiple. Simond a interprété de la même façon les observations de Labbé.

La *Klossia* de la seiche, après être restée un certain temps dans un état indifférencié, peut se transformer soit en une cellule susceptible d'être fécondée, soit en une quantité de germes mobiles qui sont des éléments fécondateurs, au même titre que les spermatozoïdes des métazoaires.

Les deux processus débutent de la même façon, de telle

1. Nous sommes obligé de faire remarquer que les figures de Labbé, en particulier celles qui se rapportent à *Klossia Eberthi*, sont très inexactes. Les *Klossia* sont toujours régulièrement arrondies et, quand la fixation est bonne, elles n'ont jamais les contours plissés et ondulés que représente Labbé ; la même critique est applicable à ses figures nucléaires. — Ainsi s'expliquent les nombreuses divergences de faits que nous avons déjà signalées et que nous aurons encore à signaler entre nos observations et les siennes. — Tous les cytologistes qui jetteront un coup d'œil sur les planches de L., se convaincront du bien fondé de nos critiques.

sorte que, quand on a affaire aux premiers stades de la transformation, on ne peut pas reconnaître le sort ultérieur de la cellule; mais nous ne pensons nullement qu'il ne soit pas déterminé d'avance.

IV

DÉBUT DE LA TRANSFORMATION DE LA KLOSSIA ADULTE

Les premiers changements consistent en un bourgeonnement du karyosome primaire. D'abord le karyosome secondaire augmente de volume, comme si une certaine quantité de la substance du gros karyosome avait pénétré à son intérieur, en suivant le pédoncule. Et en fait, c'est ce qui se produit. La substance chromatique du petit karyosome devient plus lâche, se répartit sur une boule creuse, dans laquelle pénètre la masse granuleuse amenée par le pédoncule. Le bourgeon grossit ainsi de plus en plus, et peut arriver au même volume que le karyosome primaire; il a aussi exactement la même structure.

A ce stade, nous avons donc 2 karyosomes reliés entre eux par une mince bride de substance granuleuse, et dont les orifices des membranes chromatiques se font vis-à-vis. Ils peuvent se séparer complètement par la rupture du ligament qui les unit; et alors on aperçoit, aux points où les restes de ce ligament sont en contact avec les karyosomes, deux petites sphères fortement chromatiques.

Mais, la plupart du temps, ils restent unis; et alors on voit, sur le trait d'union, une petite sphère chromatique qui s'accroît, en même temps que son contact avec le filament devient de plus en plus fragile, étant bientôt réduit à un fil de la même substance granuleuse. Le troisième karyosome ainsi formé ressemble complètement aux deux premiers et peut, ou bien leur rester uni, ou se détacher.

Les karyosomes, unis entre eux ou libres, donnent, par le même processus que nous venons de décrire, naissance à d'autres semblables. — Naturellement, les nouveaux karyosomes formés sont d'un volume moindre que les premiers, et ce volume va constamment en diminuant, de sorte que les derniers (il s'en produit souvent plus de 20) se présentent sous la forme de petites sphères où l'on peut difficilement reconnaître leur structure formée de deux cauches.

Pendant ce temps, ces deux couches restent presque exactement de même structure dans le karyosome primaire ; pourtant, la couche chromatique externe devient relativement plus mince. Nous avons une explication satisfaisante de ce fait en considérant le mode de dérivation des karyosomes secondaires du karyosome primaire. Une partie de la chromatine de la couche corticale de ce dernier se transforme dans la masse granuleuse centrale ; à cet état semi-fluide, de suspension, elle suit le filament qui unit les deux sphères et vient tapisser intérieurement la zone corticale du karyosome secondaire. Les ligaments unissant les karyosomes prennent toujours assez bien les couleurs basiques, ce qui indique qu'ils sont formés de chromatine à l'état de très fines particules.

Les zones corticales des karyosomes des autres générations se constituent de la même façon, et le résultat est la diminution d'épaisseur de la membrane chromatique du karyosome primaire ; par conséquent, la zone centrale du karyosome, présentant les réactions de l'oxychromatine, devient plus volumineuse et par suite plus visible qu'au début du processus. C'est probablement cette observation dernière qui a fait dire à Labbé qu'il y avait transformation de la basichromatine ordinaire du karyosome en oxychromatine.

Le bourgeonnement du karyosome a été constaté par Schneider et par Mingazzini, qui le considèrent comme un stade précédant la sporulation. Schneider a même remarqué que le 1^{er} bourgeon, « nucléolite », se forme au-dessus du « canal micro-pylaire » et « semble s'être échappé du centre du premier¹ ». Labbé, au contraire, voit dans la formation des bourgeons le signe de la dégénérescence du karyosome. D'après lui (p. 580), le karyosome de *Klossia* est « une sorte d'organoïde qui, au début, n'est qu'une réserve de chromatine, mais qui s'accroît peu à peu de tous les éléments excrétoires du noyau. En s'accroissant, il bourgeonne continuellement d'autres karyosomes, qui jouent le même rôle et se dissolvent ensuite, pour la plupart, dans le

1. Labbé, en traitant cette partie de la bibliographie, et parlant de la description du bourgeonnement par Schneider, dit (page 571) : « Phénomène que l'auteur assure avoir suivi *de visu*. » Dans le travail de Schneider sur la sporulation de *Klossia octopiana*, nous trouvons au contraire la phrase suivante : « ... Je ne viens pas dire: j'ai suivi *de visu* la marche du phénomène, mais l'interprétation que je suggère se présentera certainement la première à la pensée de tous... »

suc nucléaire ». La chromatine ainsi transformée se trouve, d'après le même auteur, remplacée par de nouveaux karyosomes et filaments chromatiques qui apparaissent près de la paroi du noyau après la dissolution des karyosomes primaires. Nous avons, d'après l'examen attentif de nos préparations, montré quelle était la marche du phénomène de bourgeonnement, et il nous paraît impossible de concevoir ce phénomène comme une dégénérescence, même « normale ». Notons également combien est énigmatique l'apparition de nouveaux karyosomes, d'après Labbé ; il ne dit rien en effet pour expliquer leur provenance.

A partir du stade où le karyosome primaire a donné plusieurs bourgeons, commencent à se produire des changements nucléaires qui permettent de différencier les stades ultérieurs en stades mâle et femelle.

Nous allons d'abord nous occuper de la formation des éléments mâles, des microgamètes.

V

FORMATION DES MICROGAMÈTES (FIG. 4-14).

Quand la division des karyosomes est déjà assez avancée, le noyau entier change aussi d'aspect. Son réseau chromatique ne reste plus uniquement superficiel ; ses bâtonnets et ses granules commencent à se réunir en filaments allongés.

Les petits karyosomes qui se trouvent près du réseau chromatique viennent se confondre avec lui, et leur chromatine renforce les filaments. Les autres karyosomes secondaires se dissolvent dans le suc nucléaire qui prend plus fortement l'hématoxyline (fig. 4). A la suite de la transformation du réseau chromatique, la membrane nucléaire devient de plus en plus mince, sa chromatine entrant dans la constitution de nouveaux filaments, et finalement elle disparaît complètement. Le noyau conserve encore un certain temps sa forme ronde, mais peu à peu ses limites deviennent peu distinctes ; il y a une certaine fusion avec le cytoplasme (fig. 5). Ce dernier subit aussi quelques changements consistant surtout en ce que les parois alvéolaires se disposent de façon à former des traînées radiales allant du noyau à

la périphérie de la cellule. La structure alvéolaire du cytoplasme n'est bientôt plus reconnaissable par suite de l'accroissement du nombre des granules ; cette structure granuleuse est de plus en plus accentuée, surtout au voisinage du noyau et à la périphérie de la cellule.

La fusion du noyau et du protoplasme devient de plus en plus intime. La substance nucléaire, suc et filaments de chromatine, pénètre dans les espaces intervacuolaires et se dirige vers la surface de la Coccidie (fig. 6). On voit encore quelques grands karyosomes au centre de la cellule, tandis que les petits suivent les filaments chromatiques par les voies radiaires qui existent tout autour du noyau. Les karyosomes restants se divisent et se dissolvent dans le reste du suc nucléaire ; toute la chromatine se porte ainsi vers la périphérie de la cellule (fig. 7) où elle constitue des amas ; au centre, ce qui reste du noyau se présente sous forme d'une masse granuleuse se colorant assez fortement. Peu après, les tractus qui unissent le noyau à la périphérie deviennent plus minces ; ce qui reste de chromatine au centre se dirige vers la surface et on la voit comme des granules fortement colorés répartis dans les filaments plasmiques qui rayonnent vers la périphérie. A la place occupée par le noyau, apparaissent des vacuoles.

La chromatine, située maintenant à la périphérie de la Coccidie, y est réunie en petits amas formés de filaments toujours accompagnés de très petits karyosomes.

La Coccidie, durant ces changements, prend une forme de plus en plus sphérique. Si l'on examine sa surface, on voit (fig. 8) qu'elle est couverte d'une sorte de réseau chromatique irrégulier, plus condensé en quelques points, et renfermant dans ses mailles de petites sphères se colorant très fortement (karyosomes). Il y a condensation de plus en plus grande du réseau en certains points ; les amas constitués ainsi sont de grosseur inégale et renferment un nombre variable de karyosomes. Par un phénomène de simple étirement, ces amas se divisent en deux ou plusieurs fragments qui se condensent à leur tour en affectant de plus en plus un aspect nucléaire. Division et condensation continuent, et nous arrivons à un stade tel que celui figuré en 9, où toute la surface est recouverte de noyaux à contours un peu irréguliers, espacés assez régulièrement.

Quelques noyaux se divisent encore amitotiquement. Dans le centre de ceux qui sont arrivés au terme de leur division, on peut apercevoir un petit corpuscule fortement chromatique qui, à notre avis, correspond à un petit karyosome. A cause de la difficulté de l'observation et de la petitesse des objets, il nous a été impossible de constater l'existence d'un tel karyosome dans chaque noyau. Mais nous pensons que leur présence est constante. Vus de la surface, les noyaux semblent être ronds ; mais dans une coupe de la sphère, où ils sont vus de côté, ils se présentent sous forme de petits sacs (fig. 10) qui touchent la surface du corps de la Coccidie par leur partie fermée. Les parois de ces noyaux sont formées par un réseau chromatique très compact au milieu duquel on aperçoit un corps fortement coloré, le karyosome. Par sa partie ouverte, le noyau semble communiquer avec le protoplasme de l'intérieur de la Coccidie.

Au stade suivant, on constate que les noyaux deviennent plus compacts ; autour de chacun d'eux se différencie une couche de cytoplasme plus condensé ; par suite, on aperçoit des lignes claires séparant les champs des divers noyaux (fig. 11). Bientôt, il va se constituer sur toute la surface de la sphère des excroissances, chacune d'elles étant occupée à son extrémité distale par un noyau. Ces excroissances s'allongent par une sorte d'étirement de la masse plasmique granuleuse centrale, en même temps que les noyaux se condensent et prennent la forme d'un ovale très allongé (fig. 12 et 13). Le réseau chromatique nucléaire n'est alors presque plus reconnaissable. La coloration à l'hématoxyline, par la méthode d'Heidenhain, montre une structure tout à fait compacte ; en revanche elle décèle la présence, dans la partie protoplasmique qui sert de pédoncule aux noyaux, de filaments très ténus qui se colorent en noir intense (fig. 13). Ils semblent former des *filaments axiaux* allant du noyau à la masse granuleuse centrale.

Les filaments protoplasmiques qui servent de pédoncules aux noyaux s'étirent de plus en plus, et ceux-ci deviennent aigus à leur extrémité (fig. 14). Une partie du protoplasme des pédoncules pénètre dans les noyaux ; la partie chromatique de ces corps s'allonge en effet de plus en plus, tandis que la partie cytoplasmique diminue graduellement. Dans l'intérieur des filaments chromatiques ainsi formés, on aperçoit, en employant

de très forts grossissements, quelques alvéoles, remplies de cytoplasme, disposées en file. L'étirement de la chromatine continuant, elle arrive à occuper toute la longueur des filaments qui recouvrent la sphère centrale; ces éléments se détachent alors de la masse granuleuse restante; en même temps, la partie par où ils prenaient insertion s'étire à son tour et se termine en une pointe fine.

Nous avons donc, à ce stade, une masse sphérique granuleuse centrale¹, avec quelques vacuoles, et tout autour des filaments fortement chromatiques orientés dans toutes les directions. Ces filaments sont formés de chromatine à l'exclusion de quelques espaces centraux plus clairs, formés de cytoplasme; ils ont ainsi un aspect moniliforme (fig. 16); ils sont pointus aux deux extrémités et *ne possèdent pas de cils*. Leur mobilité est très grande. Alors qu'ils sont encore attachés à la sphère de reliquat, ils peuvent se mouvoir en se pliant dans diverses directions. Dès qu'ils sont libres, ils sont animés de vifs mouvements serpentiformes. Nous désignons ces éléments sous le nom de MICROGAMÈTES. Chez la *Klossia* de la seiche, ils ont déjà été vus par divers savants. Eberth les a le premier signalés, mais ce sont surtout Schneider, Mingazzini et Labbé qui en donnent de longues descriptions. Mingazzini qui, d'une façon générale, les a bien observés et a même vu certains stades de division nucléaire préparatoires à leur formation, pense qu'ils sont homologues des sporozoïtes qui, chez les autres Coccidies, se forment directement en dehors des kystes (sporozoïtes eimériens).

Des deux autres savants, Schneider les considère comme des formations cadavériques, tandis que Labbé prétend (p. 615) que : « il n'y a aucun doute pour que ces pseudo-sporozoïtes... soient des formations tératologiques... » ; il n'a pas vu leurs mouvements, car il décrit seulement des états non adultes où, en effet, ils sont immobiles. Le même auteur donne un dessin et décrit (p. 615) un cas où il a trouvé, dans la même enveloppe kystique, des spores, chacune avec 3 noyaux, et « une masse granuleuse avec une couronne superficielle de noyaux, et ces noyaux sont juste égaux à ceux des sporozoïtes des spores. Ces noyaux formeront autant de pseudosporozoïtes, qui... auront la valeur de

1. Il arrive parfois que cette masse, au lieu de rester unique, se fragmente en deux ou trois morceaux.

sporozoïtes de spores, mais... ne seront pas des sporozoïtes ». D'après le dessin fort schématique de Labbé (fig. 11 du texte), nous pensons qu'il s'agit, dans le cas décrit par lui, d'une simple juxtaposition de deux formations distinctes ; et la membrane qu'il représente autour des deux corps est peut-être une portion de la couche muqueuse intestinale ou des restes de cellules qui se sont contractées par suite de l'action des liquides fixateurs ; mais, même si les 2 formations sont bien dans le même kyste, — ce qui nous semble peu probable, — la seule comparaison de la grandeur des noyaux n'est pas suffisante pour induire de là que, morphologiquement et cytologiquement, les sporozoïtes des sporocystes et les microgamètes sont équivalents.

On a déjà signalé, chez plusieurs Coccidies, un stade à microgamètes : Podwyssotzki, Clarke et surtout Simond, chez la *Coccidium oviforme* ; Schuberg, chez la Coccidie de la souris ; Labbé, Simond et nous-même, chez la Coccidie des tritons ; Simond chez *C. salamandræ* ; Léger et Hagenmüller, dans les genres *Diplospora* et *Barroussia* ; Schaudinn et nous, chez *Coccidium Schneideri* du *Lithobius*. La plupart de ces savants ont décrit les microgamètes, comme des filaments formés en majeure partie de chromatine, à la surface d'une grande sphère. Tout récemment, Léger¹ et Wasielewski² ont trouvé que, chez certaines Coccidies, *Barroussia*, *Echinospora* (Léger), *C. oviforme* et une Coccidie des Myriapodes (Wasielewski), — les microgamètes ont une structure particulière : leur corps, en forme de virgule ou de massue allongée, porte deux cils attachés à l'extrémité antérieure, qui est toujours plus développée ; les microgamètes se meuvent grâce à leurs cils. Nous pouvons certifier l'exactitude de ces observations pour *C. proprium*³. Mais, chez la seiche, nous n'avons noté aucune disposition semblable ; les mouvements sont d'ailleurs faciles à comprendre, étant donnée la longueur du corps des microgamètes (30 à 40 μ). Léger a d'ailleurs fait déjà cette remarque.

La division nucléaire que nous venons de décrire, et qui aboutit à la formation des microgamètes, présente un intérêt tout particulier, car elle ne ressemble ni à la karyokinèse, ni

1. LÉGER, *C. R. Soc. Biologie*, 11 juin 1898, et *C. R. Ac. Sciences*, août 1898.

2. WASIELEWSKI, *Centralbl. f. Bakt.*, 1 Abth. Bd. xxiv, 1898.

3. Dans une note que nous avons publiée sur l'évaluation de cette Coccidie (*C. R. Soc. Biol.*, 18 juin 1898), nous n'avons pas signalé ces cils. Notre dessin était fait d'après des préparations colorées où il est impossible de les distinguer.

à la division directe, amitotique. Seul. Mingazzini, qui a suivi, dans leurs grandes lignes, ces divisions nucléaires, reconnaît qu'elles diffèrent des modes connus¹; mais cet auteur les a aussi confondues avec celles qui précèdent la sporulation. Schneider et Labbé n'ont pas parlé de ce mode de division chez *Klossia*. C'est probablement divers stades de ces phénomènes de division que Labbé a décrits sous le nom de phénomènes prémitotiques ou d'épuration nucléaire. La division nucléaire de *Klossia*, d'après lui, n'a lieu que par mitose.

C'est pour la première fois, chez *C. Salamandrae*, que nous trouvons indiqué, dans le travail de Simond, ce mode de division que nous venons de décrire chez *Klossia*. L'auteur a vu la division des nucléoles jusqu'à un stade où elles sont d'un « volume n'excédant pas celui d'un coccus... Au moment, dit Simond (p. 556), où cesse leur division, elles se portent à la périphérie de la Coccidie et commencent à subir un allongement qui les fait ressembler... enfin à des cils effilés, » etc. Le même auteur donne une description à peu près semblable pour *C. proprium* et *C. oviforme*.

Avec Schaudinn, nous avons, dans une note sur les Coccidies des *Lithobius*, décrit une division nucléaire semblable conduisant à la formation des macrogamètes chez *Adelea orata*, et des microgamètes chez *Coccidium Schneideri*; nous avons indiqué que ce n'est pas une division mitotique, mais qu'elle ressemble à celle décrite par Schaudinn, chez certains Foraminifères, sous le nom de *division multiple* (multiple Kerntheilung). Chez *Calcituba polymorpha*, un Foraminifère, la division a lieu de telle façon que le noyau, d'abord compact, devient alvéolaire; puis sa chromatine se divise, en une fois, en plusieurs fractions qui vont dans des directions diverses, toutes radiales d'ailleurs. La différence principale entre la *division multiple* de Schaudinn et celle du noyau de *Klossia*, dans les stades aboutissant à la formation des microgamètes, est la suivante: chez les Forami-

1. MINGAZZINI (Contributo alla conoscenza degli Coccidi. — *Rendic. di Acad. di Lincei*, 1892, 1) dit (p. 480): « Infine noi dobbiamo riconoscere, che la divisione per cariocinesi in questi fenomeni non esiste e nemmeno quella che va col nome dei divisione diretta per strorramento... »; et plus loin il exprime l'idée que ce mode de division est intermédiaire entre la mitose et la division directe. Labbé a mal compris ses idées puisqu'il dit, dans le résumé du travail de Mingazzini (*l. c.*, p. 572): « Il n'y a pas de karyokynèse, dit Ming., mais une division directe « per strorramento » ».

nifères, la division multiple se produit *dans le même noyau*, et ce n'est qu'après leur formation que les noyaux secondaires vont dans le cytoplasme ; chez les Coccidies, la membrane nucléaire disparaît d'abord, et les nouveaux noyaux se forment dans le protoplasme, à la surface de la cellule.

Un fait mérite encore d'attirer l'attention, c'est le rôle des karyosomes dans la division multiple que nous avons décrite. Au début, leur substance sert à renforcer le réseau chromatique ; puis ils se rendent à la surface de la cellule et là servent de centres de formation de nouveaux noyaux ; ils montrent en général une grande indépendance et paraissent même exercer une sorte d'action sur diverses parties du corps de la Coccidie. Il est difficile de les comparer à quelque élément des cellules des métazoaires ou des végétaux. Ils possèdent certaines qualités des nucléoles, puisqu'ils servent à renforcer la chromatine pendant la division nucléaire, comme c'est le cas pour certaines nucléoles de métazoaires¹ ; d'autre part, ils possèdent une indépendance semblable à celle des nucléoles des plantes², qui peuvent rester dans le protoplasme de la cellule. Mais il est certain que les karyosomes représentent un élément bien spécial, possédant des propriétés diverses, et remplaçant plusieurs organes des cellules des êtres pluricellulaires, à l'état de repos ou pendant la division.

* * *

La formation des microgamètes, à partir du stade où les noyaux sont disposés à la surface d'une sphère, ressemble beaucoup à celle des spermatozoïdes des métazoaires. Nos figures montrent que le noyau, qui a d'abord une forme de capuchon, prend une forme de plus en plus allongée en entraînant à son intérieur de petites masses de cytoplasme.

Il se développe porté sur un mince pédoncule qui montre, en son milieu, un filament axial se colorant fortement. Ce mode de développement correspond tout à fait à celui des spermatozoïdes, et, en particulier, les jolies figures que Godlewski

1. KORSCHULT, Ueber Kernteilung, Eireifung, und Befruchtung bei *Ophriotrocha puerilis*. — *Zeitschr. f. wiss. zool.* Bd. 60, 1895.

2. ZIMMERMANN, *Die Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes*. — Iéna, 1896.

junior¹ a publiées sur ce processus chez *Helix pomatia* ressemblent, jusqu'à un certain point, aux nôtres (fig. 13).

Schneider et Labbé n'ont assigné aucun rôle aux microgamètes de *Klossia*, puisqu'ils ne les considèrent pas comme des stades normaux. Mingazzini croit voir dans ces éléments des sortes de germes spéciaux qui correspondent aux sporozoïtes issus des kystes.

Le premier², Schuberg a émis l'idée que les microgamètes, nommés par lui *kleinen sporozoïten*, peuvent servir pour la copulation, en disant : « ... Namentlich könnte man daran denken dass die Formen eventuell eine Copulation vermitteln möchten. »

Dans son mémoire, Simond a exposé très clairement que, à cause de leur mobilité, de leur structure chromatique, les microgamètes (ses chromatozoïtes) étaient probablement des éléments mâles. Il n'a pas observé l'acte même de la fécondation, mais il a parfaitement compris qu'il devait précéder la reproduction par sporocystes et terminer ainsi le cycle évolutif de la Coccidie.

En même temps que Simond publiait ses recherches, Schaudinn et nous communiquions à la réunion annuelle de la Société des zoologistes allemands le résultat de nos observations sur deux Coccidies du *Lithobius*; nous montrions, chez ces deux espèces, l'existence d'éléments mâles et femelles et décrivions rapidement les phénomènes de la copulation.

En 1898, nous avons publié deux notes étendant ces premières observations à la Coccidie de la seiche et à celle des

1. GODLEWSKI JUNIOR, *C. R. Acad. sciences Cracovie*, t. XXXIV (en polonais).

2. Labbé, dans des articles de critique parus récemment dans l'*Année Biologique* pour 1896, déclare à deux reprises (p. 47 et 91) qu'il a prévu le premier, et dès 1892, la reproduction sexuée des coccidies. Nous trouvons, dans une note de lui de 1891 (*C. R. Ac. sciences*, t. 113, p. 479-481) cette phrase : « Je fais remarquer combien il serait intéressant de rechercher si, chez les corpuscules falciformes des coccidies, il n'y aurait point une conjugaison analogue à celle des *Drepanidium*, conjugaison qui diffère absolument de l'apposition des *Zygocystis* et autres Grégairines. » Cette idée purement hypothétique n'a pas été confirmée, puisque la copulation des coccidies diffère complètement de celle observée par Labbé chez les Hémospories, et que d'ailleurs Laveran a été incapable de retrouver. Dans son mémoire sur les coccidies paru en 1896-1897, Labbé parle, après Schuberg, de reproduction sexuée à propos du dimorphisme des sporozoïtes de sa *Pfeifferia tritonis* (en réalité, macro et microgamètes de *Coccidium proprium*); mais il n'a observé aucun fait qui vienne confirmer son idée. Même, nous croyons pouvoir dire qu'il n'a pas compris quelles étaient les données du problème à résoudre, ni quelle en était la généralité, puisque, se trouvant en présence d'éléments mâles tout à fait typiques, ceux des *Klossia Eberthi*, il les a pris pour des formes tératologiques.

Tritons. Par conséquent, à l'heure actuelle, il est hors de doute que *les Coccidies ont une reproduction sexuée et que les microgamètes sont les éléments mâles*

VI

DIFFÉRENCIATION DES MACROGAMÈTES

La formation de l'élément femelle est des plus simples.

Revenons à la Coccidie adulte encore indifférenciée (fig. 3). Il y a d'abord bourgeonnement du karyosome, comme dans les stades à microgamètes. Mais, à partir d'un certain moment, le noyau et le protoplasme de la Coccidie prennent un aspect qui caractérise l'élément femelle. Une grande partie des karyosomes bourgeonnent un grand nombre de fois et se transforment en petits granules qui, finalement, se dissolvent dans le suc nucléaire (fig. 17). Il ne reste donc que quelques gros karyosomes qui présentent, eux aussi, une tendance à la dissolution; ils deviennent plus pâles; leur couche corticale est plus mince et souvent ils montrent quelques alvéoles claires dans leur intérieur. Le réseau chromatique devient si faiblement colorable qu'il n'est visible que sous forme de petits granules ou de très courts filaments faiblement colorés. La membrane nucléaire est très mince et à peine visible (fig. 17). Au contraire, le suc nucléaire se colore maintenant très fortement avec l'hématoxyline et se présente sous l'aspect d'une masse remplie de gros granules. Le cytoplasme — qui ne renferme ni granules plastiques ni granules chromatiques — ne montre plus de couches périphérique et périnucléaire différenciées. Il a l'aspect d'une masse creusée d'alvéoles toutes à peu près égales, les parois alvéolaires étant formées de granules qui pénètrent même à l'intérieur des alvéoles. Cette structure du protoplasme ne varie pas pendant la copulation que nous allons décrire et même jusqu'à certains stades ultérieurs assez avancés.

Ainsi formée, la cellule femelle est prête à être fécondée par les microgamètes. Notons que Schneider semble avoir représenté ce stade dans la fig. 4 de sa planche VIII.

VII

LA REPRODUCTION SEXUÉE

C'est dans la couche sous-muqueuse de l'intestin de la seiche qu'on rencontre des macrogamètes et des microgamètes mûrs. Il y a là des espaces lymphatiques très développés où la fécondation peut s'effectuer très facilement. Sur des coupes de l'intestin, on voit des microgamètes mûrs, qui ont abandonné la sphère de reliquat et qui se trouvent dans les espaces libres au milieu du tissu conjonctif, au contact de cellules femelles. A un moment donné, les microgamètes se meuvent autour des macrogamètes qui sont également libres, complètement débarrassés des restes de la cellule hôte. On voit alors quelques microgamètes accolés à la surface d'un macrogamète (fig. 18). Le noyau de ce dernier se porte vers la surface et son contenu se dispose de telle façon que la plupart des karyosomes et les filaments de chromatine se trouvent dans la partie la plus éloignée de la périphérie de la cellule. La cellule s'arrondit, devient presque sphérique. Une partie de son noyau se trouve au contact de la surface de la cellule, au point où se trouvent accolés les microgamètes. C'est à ce moment qu'il y a *pénétration de l'élément mâle à l'intérieur de la vésicule nucléaire femelle*. Immédiatement après, le noyau femelle abandonne le voisinage immédiat de la surface de la cellule. En même temps, la couche protoplasmique périphérique du macrogamète fécondé devient réfringente; mince au début, elle s'épaissit lentement, et à sa surface restent accolés les microgamètes qui n'ont pas servi à la fécondation; on les aperçoit là souvent très longtemps en voie de dégénérescence. La *membrane* de l'œuf est ainsi constituée¹.

Le noyau femelle contenant à son intérieur le microgamète se retire lentement vers le milieu de la cellule et prend une forme allongée. Son réseau chromatique, de plus en plus visible, occupe la partie opposée à celle par où a pénétré l'élément mâle. La chromatine de ce dernier se dissout en un spirème de filaments chromatiques qui se rapproche, en s'étirant, de la chromatine

1. Sur les figures, nous avons représenté la membrane comme on l'aperçoit sur les préparations fixées, c'est-à-dire plissée. Mais le *corps cellulaire n'est jamais contracté; il garde toujours une forme bien sphérique*.

femelle (fig. 19). On peut parfois distinguer dans son milieu un ou deux corpuscules ronds qui sont peut-être des karyosomes. Le réseau chromatique de la cellule femelle s'accroît; le reste des karyosomes se fragmente. En même temps, le suc nucléaire devient moins colorable; nous pensons que la chromatine qu'il contenait en dissolution est fixée sur le réseau chromatique.

Le noyau entier s'allonge et, du côté opposé à celui où a pénétré le microgamète, on observe une sorte de trace granuleuse qui pénètre dans le protoplasme et va jusqu'à sa surface (fig. 19 et 20). Dans cette région terminale, les contours du noyau ne sont pas visibles, tandis que tout le reste est parfaitement limité. Les réseaux chromatiques mâle et femelle se rapprochent et arrivent au contact. On voit encore, pendant un certain temps (fig. 20), la chromatine mâle plus fortement colorée et condensée. Mais finalement, il y a mélange intime. Les filaments du réseau chromatique sont disposés parallèlement à l'allongement du noyau. La chromatine commence à former un fuseau qui va d'un bout à l'autre du noyau, et par suite de la cellule; en même temps les karyosomes restent au centre. Nous avons représenté (fig. 6 de notre note préliminaire) ce stade. Le réseau chromatique se présente sous la forme d'un long filament replié en deux et tordu légèrement, qui atteint, par sa partie coudée, la surface de la cellule opposée à celle par où s'est faite la pénétration du microgamète; vers le milieu du noyau, le filament porte un spirème de chromatine assez condensé (fig. 21). Ce stade est tout à fait caractéristique.

Plus tard, les contours du noyau deviennent plus nets et il revient à la forme ronde. On voit encore le filament chromatique et même le prolongement nucléaire allant jusqu'à la surface de la cellule; mais le réseau du centre du noyau (fig. 21) a acquis une importance prépondérante. Les karyosomes s'émiettent de plus en plus, et le cordon chromatique se transforme en un réseau irrégulier. Encore quelques divisions de karyosomes, un arrondissement du noyau, et ce dernier est prêt à se diviser en deux pour entrer dans la phase de formation des sporocystes et des sporozoïtes. Les phénomènes sexuels sont terminés.

Les stades que nous venons de décrire ont été signalés dans notre note préliminaire, pour la première fois, chez la *Klossia* de

la seiche. Mais chez d'autres Coccidies, nous avons fait connaître des phénomènes semblables, aussi bien chez *Coccidium Schneideri* et *Adelea ovata* de l'intestin des *Lithobius* que chez *C. proprium* des tritons. Il y a, dans tous les cas, pénétration d'un élément mâle, de petite taille, et fortement chromatique, dans une grande cellule ayant les caractères d'un œuf. Chez *C. proprium* et *C. Schneideri*, les microgamètes se forment, comme chez *Klossia octopiana*, à la surface de gros reliquats de différenciation qu'ils abandonnent à la maturité pour aller à la recherche des macrogamètes.

Chez *Adelea ovata*, la formation des éléments mâles définitifs a lieu en deux temps ; dans le premier, la cellule coccidienne indifférenciée se divise en un petit nombre de croissants (8 à 12) qui vont se coller à la surface des cellules femelles. Là, s'accomplit la seconde étape, chaque croissant donne naissance à quatre éléments tout à fait identiques aux microgamètes des *Coccidium*, et qui se forment aussi à la surface d'un reliquat de différenciation. La seule différence consiste donc en ce que, chez *Adelea*, ce reliquat est subdivisé, avant la formation des microgamètes, en autant de fragments qu'il y a de croissants.

Au point de vue des phénomènes de la fécondation, le genre *Coccidium* ressemble moins à *Klossia* que *Adelea ovata*. Chez *C. Schneideri* et *C. Proprium*, le noyau femelle, avant la copulation, perd sa membrane et entre en contact direct avec le protoplasme. Ses contours ne sont pas réguliers ; la plus grande partie de sa masse reste au centre de la cellule, pendant qu'un prolongement seul atteint la surface. Les microgamètes se dirigent vers ce point qui, chez *C. Schneideri*, représente une sorte de micropyle existant, en réalité, chez *C. proprium*.

Chez *Adelea ovata*, le noyau, avec un réseau où la chromatine est en partie dissoute, se porte tout entier, comme chez *Klossia*, à la surface de la cellule, vient à son contact, et un des quatre microgamètes formés sur le croissant accolé au macrogamète y pénètre. Ultérieurement, le noyau résultant de l'union des parties mâle et femelle prend la forme d'un fuseau traversant la cellule fécondée dans toute sa longueur ; il y a encore là un phénomène beaucoup plus comparable à ce que nous avons décrit chez *Klossia* que chez les autres Coccidies.

Les autres savants qui ont parlé de phénomènes sexuels chez

les Coccidies ont émis des idées diverses sur les circonstances dans lesquelles ils se produisent ; mais aucun d'eux ne les a observés. Labbé constate la présence de deux sortes de germes endogènes chez la Coccidie des tritons (sa *Pfeifferia tritonis*) : les uns de grande taille, qu'il appelle *macrosporozoïtes* (stade eimérien), les autres de petite taille, les *microsporozoïtes* ; il pense qu'une copulation est possible entre ces deux sortes d'éléments, *tels qu'ils existent au moment de leur formation*. On sait, après les observations de Simond et les nôtres, que cette interprétation est erronée. Simond, dans son excellent mémoire, a bien indiqué que « il est à supposer que c'est un mérozoïte des formes de reproduction asporulée qui subit la fécondation par conjugaison avec le chromatozoïte ». Chez le *C. oriforme*, Simond remarque, à la surface du noyau de formes jeunes, *arrondies*, une sorte de croissant de chromatine qui se soude peu à peu avec le karyosome sphérique central ; et il regarde le croissant comme le noyau d'un chromatozoïte qui avait fécondé la jeune Coccidie. Il nous est impossible de partager la manière de voir de Simond ; ce croissant ne représente, suivant nous, qu'une partie du réseau nucléaire, un peu plus condensée. Nous sommes convaincu, en effet, que la fécondation, chez *C. oriforme*, doit se faire dans des circonstances identiques à celles que nous avons décrites chez la Coccidie des tritons.

*
* *

Il est très difficile de se rendre compte, chez la *Klossia* de la seiche, si seulement un microgamète pénètre dans la cellule femelle. Nous sommes bien persuadé qu'il n'y en a qu'un. On peut en effet remarquer que le réseau mâle, visible peu après la copulation, ne représente pas une quantité de chromatine supérieure à celle d'un microgamète. La comparaison avec *Adelea ovata* confirme notre opinion ; dans ce cas, où quatre éléments mâles pourraient pénétrer, il n'en entre sûrement qu'un, puisqu'on aperçoit les trois autres à côté de la cellule fécondée.

*
* *

Les phénomènes que nous avons décrits ont beaucoup d'analogie avec ceux de la fécondation des œufs des métazoaires. Là

aussi, il y a association de deux individus, dont l'un renferme seul du protoplasme et des matières de réserve, dont l'autre apporte de la chromatine et semble être le déterminant de l'évolution de la cellule femelle. Le spermatozoïde pénètre dans l'œuf, se transforme en un réseau chromatique indépendant, accompagné de deux centrosomes qui deviennent les centres des asters du premier fuseau de division. Il se produit un mélange des chromatines et des systèmes cytoplasmiques, et l'œuf fécondé est susceptible de toute une évolution cellulaire.

Il est certain que, chez *Klossia*, c'est le microgamète qui est comparable au spermatozoïde et le macrogamète à l'œuf. Le mélange des chromatines de ces deux éléments est aussi net que possible; on voit aussi une transformation du microgamète en un réseau chromatique indépendant et semblable à celui de la cellule femelle. Il y a donc ressemblance entre les noyaux mâle et femelle, comme dans les œufs fécondés des métazoaires. Y a-t-il aussi mélange de systèmes cytoplasmiques, chez *Klossia*? Cette question est très difficile à résoudre; nous pensons pourtant que le microgamète emporte avec lui une petite quantité de protoplasme, de sorte qu'il contient tous les éléments principaux d'une cellule, aussi bien que les spermatozoïdes. Nous avons souvent observé, au centre du réseau chromatique provenant d'un microgamète qui a pénétré dans le noyau d'un macrogamète, de petits corpuscules ayant tous les caractères de karyosomes (fig. 19). Ils proviennent certainement du microgamète, et nous pensons que ce sont de véritables karyosomes introduits dans la cellule femelle, comme un élément essentiel de la cellule mâle.

*
* *

Rappelons que l'œuf fécondé des métazoaires a la valeur d'une cellule entière, tandis que, avant la copulation, chacun des éléments mâle et femelle était une demi-cellule au point de vue du nombre des anses chromatiques. La question de savoir s'il y a aussi, chez la *Klossia* de la seiche, des phénomènes de réduction, est difficile à trancher.

Les figures que donne Labbé, comme illustration de la réduction chromatique (pl. XV, fig. 10, 14, 15, 16) nous semblent représenter, au contraire, certains stades de la fécon-

dation ou de la division cellulaire, altérés par l'action des réactifs (comparer les fig. 5 et 20 de ce mémoire avec la fig. 10 de la pl. XV de Labbé). Pour nous, la réduction chromatique se produit ici de la façon suivante : il y a dissolution de chromatine dans le suc nucléaire ; puis, aux premiers stades qui suivent la fécondation, la membrane nucléaire devient très mince et le noyau s'allonge lentement en se confondant avec le protoplasme environnant dans ce prolongement ; alors une partie de la chromatine, dissoute dans le suc nucléaire, peut se répandre dans le protoplasme. Celui-ci, en effet, se colore plus fortement aux stades que nous venons d'indiquer, et on y aperçoit même quelques granules très colorés (fig. 19 et 20) qui ne s'y trouvaient pas auparavant. Jamais nous n'avons observé, chez *Klossia*, une réduction comparable à celle que nous avons signalée, avec Schaudinn, chez *Adelea ovata*.

Quant à la réduction de la chromatine chez les microgamètes, elle a probablement lieu par le fait de leur formation en nombre considérable aux dépens d'une cellule. Leur ressemblance avec des spermatozoïdes confirme d'ailleurs cette manière de voir.

VIII

LA FORMATION DES SPOROCYSTES

D'après Schneider, les phénomènes, chez la *Klossia* de la seiche, se passent ainsi : le noyau se divise par étranglement à la surface de la Coccidie, en prenant la forme « en bretelles » ou « en os de grenouille ». Autour de chaque nouveau noyau, se fait une proéminence protoplasmique, et la Coccidie entre dans un stade d'Echinosphère. Chaque proéminence s'arrondit, se détache de l'ensemble, s'entoure d'une membrane, et donne naissance à trois ou exceptionnellement quatre sporozoïtes.

Mingazzini a confondu les stades de la division nucléaire, qui conduisent à la formation des microgamètes, avec ceux relatifs à la formation des sporocystes ; il croit que ces derniers résultent des noyaux qui, après la division multiple, se trouvent à la surface de la Coccidie.

Labbé pense que, après sa prétendue épuration ou réduction

nucléaire, se présentent plusieurs divisions karyokinétiques conduisant à la formation d'un certain nombre de noyaux à la surface de la Coccidie; la formation « d'archéspores » avec ces noyaux se produit de la façon indiquée par Schneider; mais, dans les archéspores, on voit apparaître, à côté du noyau, des centrosomes surtout bien visibles au moment où le noyau se divise pour produire ceux des sporozoïdes. Nous n'avons jamais rencontré de figures semblables à la fig. 6 (pl. XV) de Labbé. Étant donné le contour irrégulier de la cellule, peut-être s'agit-il d'une disposition artificielle ressemblant à une figure karyokinétique. Les autres figures de Labbé, relatives soi-disant à la division mitotique, correspondent probablement à nos figures 23 et 24, coupées obliquement.

Nos observations sur la sporulation de *Klossia* s'accordent, dans leurs traits généraux, avec celles de Schneider et y ajoutent quelques détails nouveaux.

Le noyau d'une Coccidie fécondée, alors qu'il a abandonné la surface de la cellule, montre un réseau chromatique très distinct; les karyosomes sont à l'état de petites boules très colorées. Le suc nucléaire se colore à peine, et il semble que toute la chromatine qu'il contenait en dissolution est maintenant fixée sur le réseau. La membrane nucléaire n'est pas aussi compacte que dans un noyau au repos.

A cet état, le noyau commence à s'étrangler et à se diviser lentement par traction en deux parties égales (fig. 22). Le réseau chromatique se place aux deux extrémités du noyau en division, et il semble que le volume de la chromatine dans les deux noyaux frères est égal. Les karyosomes se disposent aussi, en volumes égaux, de part et d'autre. L'étranglement continue, et finalement on a deux noyaux séparés à la surface de la *Klossia*. Ils continuent à se diviser de la même façon que le premier noyau, par simple étranglement; il se forme ainsi 4, puis 8, etc., nouveaux noyaux. On peut toujours observer une certaine régularité dans ces divisions de telle façon que la chromatine et les karyosomes sont toujours répartis également dans les noyaux nouveaux. A mesure que les noyaux se divisent, leur structure devient de plus en plus distincte; ainsi, au stade que représente notre figure 23, le réseau des noyaux au repos est formé d'un peloton lâche de chromatine et renferme un karyosome. Pendant leur

division, les noyaux imitent un peu les figures mitotiques et on peut remarquer un corpuscule fort coloré, qui correspond peut-être aux « Zwischenkörper » de Flemming et Kostanecki.

Autour de chaque noyau, se différencie une portion de protoplasme qui fait proéminence à la surface de la *Klossia* (fig. 24). A ce moment, les noyaux ont déjà pris une structure plus compacte, et chez ceux qui ont atteint leur structure définitive, on ne peut plus distinguer les karyosomes; leur réseau est plus condensé du côté externe des proéminences protoplasmiques qui les renferment. Les dernières divisions nucléaires ressemblent beaucoup à des mitoses, car la membrane nucléaire disparaît et on observe une répartition de la chromatine en deux amas, comme dans un « dyaster » d'une mitose.

Lorsque toutes les divisions nucléaires sont terminées, les excroissances protoplasmiques s'arrondissent et enfin se séparent les unes des autres après avoir absorbé tout le protoplasme de la *Klossia*. Elles sont toutes réunies à l'intérieur de la membrane kystique, chaque boule est un futur *sporocyste*, d'après la terminologie de Léger; elle s'entoure d'une mince membrane propre (fig. 25) et le protoplasme y montre une structure alvéolaire. A sa périphérie est situé un noyau très compact. Dans son protoplasme, on aperçoit quelques corpuscules, ronds ou irréguliers, fortement chromatiques, placés entre ou dans des alvéoles plasmiques: ils correspondent peut-être à ce que Labbé appelle des centrosomes.

Le noyau du sporocyste se divise par simple étranglement, à l'intérieur de la membrane nucléaire: et, en règle générale, la division se fait, du même coup, en 3 parties. C'est une simple division amitotique, durant laquelle il est très difficile de voir même le réseau chromatique du noyau.

Après la division nucléaire, le protoplasme se condense autour de chaque nouveau noyau (ils ont la forme de bâtonnets courts et épais), et les champs plasmiques, en forme de croissants, se séparent; on a ainsi formation de 3 sporozoïtes. Leur protoplasme est très condensé et montre parfois quelques granules chromatiques; les noyaux, qui sont au début allongés, prennent ensuite une forme ronde (fig. 25). A cet état, les sporozoïtes sont complètement mûrs.

Les ookystes, renfermant des sporocystes et des sporozoïtes,

sont souvent de si grande taille (jusqu'à 1 millimètre de diamètre), qu'ils sont visibles à l'œil nu. Leur formation termine le cycle évolutif de la *Klossia* de la seiche.

IX

INFECTION DE LA SEICHE

Un sporocyste mûr, arrivé dans l'intestin de la seiche, éclate et les sporozoïtes sont mis en liberté. Le tube digestif de la seiche est tapissé intérieurement par un épithélium cilié dans lequel sont placées les cellules à sécrétion muqueuse. Les cils des cellules épithéliales sont très forts et très longs, et vibrent avec une telle force que les petits sporozoïtes, malgré leur grande mobilité, ne peuvent arriver au plateau de la cellule. Ils pénètrent donc par une autre voie; ils entrent dans l'intérieur des cellules muqueuses et peuvent ainsi, par cette voie détournée, arriver *latéralement* dans les cellules ciliées.

Par une de ses extrémités, le sporozoïte appuie contre la paroi de la cellule dans laquelle il va pénétrer; il détermine ainsi une petite ouverture par où il pénètre en partie; le reste de son corps se contracte assez fortement et ainsi tout le petit vermicule se trouve projeté dans la cellule épithéliale. Arrivé là, il va se placer tout près du noyau; il montre une tendance à s'arrondir; son protoplasme ne reste plus aussi compact, mais prend une structure alvéolaire, et on aperçoit à son intérieur quelques vacuoles claires (fig. 4).

En même temps, le noyau compact du sporozoïte prend une structure plus lâche; l'individualisation du réseau chromatique commence. Pendant la même période, a lieu la formation du karyosome qui, invisible dans les sporozoïtes, apparaît déjà formé dès que la différenciation du réseau chromatique permet d'observer l'intérieur du noyau.

Aux dépens de la cellule infectée, la jeune *Klossia* s'accroît de plus en plus, en même temps que se différencie sa structure. A l'intérieur de son cytoplasme apparaissent les diverses sortes de granules décrits précédemment, qui, au bout d'un certain temps, sont digérés et transformés dans le corps de la Coccidie. La forme du corps est de plus en plus ronde; le noyau prend une disposition transversale, et finalement nous arrivons à un stade

tel que celui de la fig. 3 qui nous a servi de point de départ.

Résumons donc le cycle évolutif de la *Klossia* de la seiche :

Les *sporozoïtes*, sortis des *sporocystes*, pénètrent dans les cellules de la paroi intestinale et là se transforment en *individus adultes indifférenciés*. Parmi ceux-ci, les uns subissent une division nucléaire multiple et se transforment en éléments mâles ou *microgamètes*, tandis que les autres montrent quelques changements nucléaires et prennent les caractères de cellules femelles ou *macrogamètes*. Après la copulation d'un microgamète avec un macrogamète, ce dernier s'entoure d'une membrane, devient un *ookyste*, et son noyau, qui renferme les chromatines mâle et femelle, se multiplie dans la surface par un certain nombre de divisions égales, rappelant un peu des divisions mitotiques. Autour des nouveaux noyaux s'individualise une couche cytoplasmique; les *sporocystes* se trouvent ainsi constitués. Dans l'intérieur de chaque sporocyste se forment 3-4 *sporozoïtes*; et le cycle évolutif est fermé.

Ce cycle diffère de celui des autres Coccidies par l'absence d'une multiplication cellulaire (stade à mérozoïtes de Simond, stade eimérien de Léger) précédant la formation des macrogamètes.

X

LÉSIONS PRODUITES PAR LE PARASITE. — AUTOINFECTION.

Les sporozoïtes, nous l'avons dit, pénètrent uniquement dans les cellules épithéliales ciliées, et, en règle générale, en traversant les cellules muqueuses. Placé au milieu du cytoplasme de la cellule-hôte, le parasite entre en contact direct avec lui, et c'est seulement à cause de la différence de réfringence et de colorabilité des 2 milieux qu'on distingue les contours de la jeune Coccidie. Il ne se forme aucun espace clair, perceptible autour d'elle; il n'y a que dans les préparations mal fixées qu'on distingue une auréole claire avec des brides protoplasmiques allant de la Coccidie au plasma de la cellule épithéliale; cet aspect tient à une contraction. On n'observe donc aucune trace d'une sécrétion de substance quelconque provoquée par la pénétration, comme le pense et le figure Labbé. Néanmoins une action réciproque des deux cellules en présence est évidente. Tandis que le sporozoïte

s'accroît et se transforme en un être adulte, la cellule éprouve des changements qui se succèdent dans l'ordre suivant; il y a une période d'excitation suivie de dégénérescence.

Tous les phénomènes d'accroissement de la Coccidie que nous avons décrits ne pourraient pas se réaliser sans les matériaux fournis par la cellule-hôte; ils pénètrent dans la Coccidie par simple osmose. Les matériaux nutritifs introduits ainsi sont emmagasinés par le parasite sous forme de différents granules, dans son protoplasme. La cellule hôte conserve d'abord sa forme (fig. 4) et toutes ses propriétés. Les cils vibrent fortement et le noyau conserve sa forme ordinaire. Mais la présence et l'accroissement du parasite semblent exciter la cellule-hôte; elle commence à montrer des vacuoles remplies d'un liquide clair, et sa structure entière devient moins compacte. En même temps, son noyau grossit et commence à se colorer d'une façon très intense, mais diffuse. La cellule entière semble s'être gonflée et montre une hypertrophie considérable.

Le parasite s'accroît de plus en plus, et il semble que l'hypertrophie de la cellule-hôte lui fournisse un surcroît de matériaux pour son développement. Il arrive à occuper un volume tel que la cellule de la seiche est considérablement distendue, réduite à ses parois; on ne distingue plus que son noyau aplati par la pression du parasite (fig. 10).

A partir de ce moment commence la dégénérescence de la cellule-hôte; elle devient facilement perméable et des sporozoïtes de *Klossia* pénètrent qui vont se placer à côté de la grosse Coccidie; il y a alors *infection multiple*. La Coccidie, continuant à s'accroître, assimile le reste du protoplasme de la cellule-hôte, de sorte qu'il ne reste qu'une très mince couche périphérique et un noyau dégénéré et aplati à côté.

A ce stade, la Coccidie est déjà presque adulte, mais possède encore les matériaux de réserve accumulés comme granules dans son protoplasme. Leur assimilation et l'accroissement qui en résulte pour la Coccidie font éclater le reste de la cellule épithéliale et le parasite tombe dans la couche sous-muqueuse de l'intestin. Désormais, il n'est plus intracellulaire; il est intercellulaire; le fait a été très bien observé par Labbé.

Dans les espaces lymphatiques de cette couche sous-muqueuse, se passent tous les phénomènes que nous avons décrits et qui

aboutissent à la formation des ookystes... Les gros ookystes, qui ont souvent 1/2 ou 1 millimètre de diamètre, provoquent une réaction du tissu conjonctif et sont entourés d'une couche cellulaire assez compacte. A cet état, ils peuvent rester très longtemps dans la paroi intestinale.

La destruction des cellules épithéliales de l'intestin par les parasites provoque, comme réaction, dans toute la couche muqueuse, la plus active division karyokinétique des cellules infectées. Nous savons qu'un fait pareil a été remarqué par Simond pour l'épithélium intestinal des tritons. L'explication la plus probable est qu'il s'agit ici de remplacement des cellules détruites par de nouveaux éléments intacts.

Très souvent, nous avons observé, sur des coupes de l'intestin de la seiche, les sporocystes en dehors de la membrane commune, disséminés dans les espaces lymphatiques du tissu conjonctif sous-muqueux; en particulier, dans le voisinage de la couche épithéliale, on peut apercevoir des groupes de sporocystes, qui semblent chercher à s'insinuer entre les cellules épithéliales. Dès qu'un espace libre se forme entre elles, les sporocystes, probablement par suite de la pression du liquide qui les entoure, se placent entre les éléments épithéliaux. Une rupture de la couche, souvent produite par une dégénérescence des cellules, permet aux sporocystes d'arriver dans la lumière de l'intestin. Là, sous l'action du suc digestif, leur membrane éclate; les sporozoïtes s'échappent, se dirigent vers les cellules épithéliales et déterminent une nouvelle poussée infectieuse.

Ces faits nous expliquent très bien comment, chez *Klossia octopiana*, qui ne possède pas de stades de multiplication endogène (stades cimériens), l'autoinfection se produit. Mingazzini a remarqué, avant nous, que les sporocystes peuvent arriver par effraction, à travers les parois intestinales, dans la lumière du tube digestif.

Chez la *Klossia* de la seiche, par conséquent, un cycle évolutif aboutissant à la formation de sporocystes à sporozoïtes, suffit à fournir des germes à la fois pour l'infection d'autres céphalopodes, et pour l'autoinfection.

Ce fait, que nous croyons avoir bien mis en évidence, n'est nullement en opposition avec la théorie du *dimorphisme évolutif* émise par R. Pfeiffer, acceptée et prouvée par Schuberg, Simond,

Léger et la quasi unanimité des savants qui se sont occupés de Coccidies. On peut l'énoncer ainsi : *Il y a, chez les sporozoaires du groupe des Coccidies, succession de deux périodes dans l'évolution, l'une endogène avec multiplication des germes, produisant l'autoinfection : l'autre, précédée de phénomènes sexués (Simond, Schaudinn et Siedlecki), qui donne des individus enkystés, résistants, formant dans leur intérieur des sporocystes à sporozoïtes, capables de quitter l'organisme hôte pour transporter l'infection chez d'autres individus.* Il est évident que, chez *Klossia*, la facilité de l'autoinfection rend inutile la multiplication endogène des parasites, et la première période se trouve réduite à sa plus simple expression : un sporozoïte issu d'une spore donne directement un macrogamète. D'après cela, il est évident que le cycle évolutif de la *Klossia octopiana* rentre bien dans le type que l'on avait pu déduire des observations faites chez d'autres Coccidies.

Le stade de multiplication endogène des parasites, qui existe chez toutes les Coccidies étudiées avec soin, à l'exception de *Klossia octopiana*, existe aussi chez d'autres sporozoaires. C'est, comme le reconnaissent d'ailleurs Simond et Laveran, à cette multiplication que correspondent les stades en morula, rosette ou marguerite, des hématozoaires de l'homme et des oiseaux, et aussi les stades de reproduction que Laveran¹ vient de faire connaître chez les parasites du sang de la tortue d'eau et de *Rana esculenta*.

Caullery et Mesnil² ont décrit un stade semblable chez une Gregarine célomique. La théorie de R. Pfeiffer, modifiée par les recherches récentes, présente donc une grande généralité.

1. LAVERAN, *C. R. Soc. Biolog.* (1^{er}, 8 et 22 octobre 1898).

2. CAULLERY ET MESNIL, *C. R. Acad. des sciences* (17 janvier 1898).

EXPLICATION DES PLANCHES VII, VIII & IX

Tous les dessins ont été faits à la chambre claire de Abbe, avec l'immersion apochromatique de 1^{mm},30 d'ouverture et 2^{mm} de foyer.

Fig. 1. — Cellule épithéliale de l'intestin d'une seiche avec jeune *Klossia*.

Fig. 2. — Jeune *Klossia*. Le karyosome est uni à la périphérie du noyau par un secteur chromatique.

Fig. 3. — Stade adulte indifférencié.

Fig. 4-16. — *Formation des microgamètes.*

Fig. 4. — Apparition des filaments chromatiques dans le noyau.

Fig. 5. — Les contours du noyau deviennent irréguliers.

Fig. 6. — La chromatine nucléaire se rend à la périphérie de la Coccidie.

Fig. 7. — Même phénomène plus avancé.

Fig. 8. — Répartition de la chromatine à la surface de la Coccidie.

Fig. 9. — Condensation de la chromatine préparatoire à la formation des noyaux des microgamètes.

Fig. 10. — Coupe optique d'une Coccidie montrant les noyaux *en sac* des microgamètes. En bas et à droite, noyau aplati de la cellule hôte.

Fig. 11. — Division protoplasmique à la surface de la Coccidie.

Fig. 12. — Stade de l'évolution des microgamètes.

Fig. 13. — Même stade. — Dans les pédoncules qui supportent les noyaux des microgamètes, on distingue des lignes longitudinales plus foncées (*filaments axiaux*).

Fig. 14. — Stade de l'évolution des microgamètes avec noyaux allongés.

Fig. 15. — Microgamètes mûrs à la surface de la sphère de reliquat.

Fig. 16. — Aspect des microgamètes mûrs; au centre des renflements, on remarque des espaces plus clairs, de nature cytoplasmique.

Fig. 17-18. — *Maturation des macrogamètes.*

Fig. 17. — Bourgeonnement des karyosomes.

Fig. 18. — Macrogamète mûr. — Le noyau est venu au contact de la surface de la cellule; et en ce point, on aperçoit plusieurs microgamètes.

Fig. 19-21. — *Phénomènes sexuels.*

Fig. 19. — Le microgamète a pénétré et s'est transformé en un réseau chromatique situé à un pôle du noyau femelle qui, à l'autre pôle, se termine par une sorte de queue. (A partir de ce stade, on remarque une membrane kystique autour de la Coccidie.)

Fig. 20. — Mélange complet des chromatines mâle et femelle.

Fig. 21. — Stade plus avancé que le précédent.

Fig. 22-26. — *Formation des sporocystes.*

Fig. 22. — Première division nucléaire.

Fig. 23. — Divisions nucléaires dans la surface; — *z*, *Zwischenkörper*.

Fig. 24. — Dernières divisions nucléaires. — Différenciations protoplasmiques autour des noyaux.

Fig. 25. — Sporocystes au stade uninucléé; dans le protoplasme, quelques granules chromatiques.

Fig. 26. — Sporocyste mûr avec 3 sporozoïtes.

ÉTUDES SUR L'IMMUNITÉ VACCINALE

Par MM.

A. BÉCLÈRE

Médecin de l'hôpital St-Antoine.

CHAMBON et MÉNARD

Directeurs de l'Institut de vaccine animale
de Paris.

DEUXIÈME MÉMOIRE

L'IMMUNITÉ CONSÉCUTIVE A L'INOCULATION SOUS-CUTANÉE DU VACCIN

L'étude expérimentale du sérum de génisse vaccinée, recueilli plusieurs jours ou plusieurs semaines après la dessiccation des vésicules vaccinales, nous a conduits, dans un premier mémoire¹, à la conclusion que ce sérum possède, vis-à-vis de la vaccine inoculée, des propriétés immunisantes.

C'est ce qui résulte d'une expérience capitale, plusieurs fois répétée avec des résultats constants : le sérum de génisse vaccinée, injecté sous la peau d'un animal de même espèce, à la dose du centième de son poids, immédiatement avant la vaccination à l'aide de nombreuses inoculations sous-épidermiques d'un virus éprouvé, confère à cet animal une immunité encore incomplète, mais suffisante cependant pour rendre stériles le plus grand nombre des inoculations, pour donner aux rares éléments éruptifs un aspect rudimentaire et avorté, et surtout pour faire perdre toute virulence appréciable à la lymphé contenue dans ces éléments, puisqu'elle n'est plus inoculable à des sujets non vaccinés, enfants ou génisses.

Cette injection de sérum immunisant modifie la morphologie des éléments éruptifs moins complètement qu'elle ne détruit la virulence de leur contenu : des vésicules à peu près normales d'apparence renferment cependant une lymphé qui n'est plus inoculable.

1, *Ces Annales*, n° du 25 janvier 1896.

L'action immunisante de ce sérum se révèle encore par l'insuccès total d'un certain nombre d'inoculations, par l'aspect plus ou moins rudimentaire des éléments éruptifs et surtout par l'atténuation plus ou moins complète de la virulence du contenu de ces éléments, quand l'injection sous-cutanée de sérum, au lieu de précéder les inoculations sous-épidermiques de vaccin, suit celles-ci à un intervalle de vingt-quatre et même de quarante-huit heures.

Le sérum de génisse vaccinée possède donc, vis-à-vis de la vaccine inoculée, non seulement un pouvoir préventif, mais encore un pouvoir curateur, d'autant plus faible, il est vrai, que l'intervention thérapeutique survient plus tard après l'inoculation.

Cette action immunisante, plus ou moins parfaite suivant la quantité du sérum injecté et le moment de l'injection, se manifeste toujours très rapidement.

L'immunité conférée par le virus vaccinal, injecté sous la peau, ne se développe au contraire que lentement. Après trois jours, rien ne la révèle, et elle ne semble pas encore complète avant huit jours écoulés. Un animal, vacciné à l'aide de nombreuses inoculations sous-épidermiques trois jours après avoir reçu du vaccin sous la peau, n'en présente pas moins une éruption d'aspect parfaitement normal; c'est seulement quand l'intervalle est de huit jours que les inoculations du même vaccin sous l'épiderme demeurent stériles sans aucune exception.

Dans nos premières recherches, nous avons injecté une quantité déterminée de vaccin sous la peau d'une série de génisses, puis nous les avons inoculées successivement par le procédé habituel des incisions multiples aux deux côtés du tronc, en mettant entre les deux opérations un intervalle d'un jour pour la première génisse, de deux jours pour la seconde, de trois jours pour la troisième, et ainsi de suite. Mais nous nous étions contentés de noter soigneusement l'aspect de l'éruption vaccinale sur chaque animal, sans chercher à mesurer le degré de virulence du contenu des éléments éruptifs. Nous avons voulu combler cette lacune et nous avons répété quelques-unes des expériences (de VI à XVII) publiées dans notre premier travail, en y ajoutant la recherche de la virulence de la lymphé vaccinale.

EXPÉRIENCE X *bis*.

INOCULATION VACCINALE SOUS-CUTANÉE PRÉCÉDANT DE *trois* JOURS LES INOCULATIONS SOUS-ÉPIDERMiques

Une génisse, amenée la veille du Limousin à l'étable d'isolement de la rue Caulaincourt, reçoit en injection sous la peau du flanc gauche, à l'aide de la seringue de Straus, tout le contenu d'un gros tube à vaccin, rempli de pulpe glycinée préparée depuis deux mois (soit environ 5 centigrammes d'eau bouillie, 5 centigrammes de glycérine et 10 centigrammes du produit de grattage des vésicules¹).

Trois jours après, cette génisse est inoculée sous l'épiderme, aux deux côtés du tronc, avec du vaccin éprouvé, comme il est de règle à l'établissement vaccinal de la rue Ballu, c'est-à-dire par des incisions linéaires de 2 centimètres, écartées de 3 à 4 centimètres les unes des autres et disposées en quinconce, au nombre de 80 à 120 environ sur chaque côté.

À la même heure, une génisse témoin, qui n'a rien reçu sous la peau, est inoculée semblablement sous l'épiderme avec le même vaccin.

Chez ces deux génisses, l'éruption vaccinale apparaît, dans les délais habituels, avec ses caractères normaux, et ne présente, de l'une à l'autre, que des différences négligeables qui tiennent aux conditions individuelles : toutes les inoculations donnent naissance à des vésicules de forme très régulière, limitées par des lignes bien droites, parallèles aux incisions.

Chez la génisse en expérience et chez la génisse témoin, on fait successivement, à 24 heures d'intervalle, trois récoltes de lymphé vaccinale : on recueille dans les vésicules de chacun des deux animaux et on prépare séparément, sous forme de pulpe glycinée, suivant le mode habituel, du vaccin datant de *quatre* jours, de *cinq* jours et de *six* jours après les inoculations sous-épidermiques.

Les trois vaccins provenant de la génisse témoin peuvent être considérés comme normaux et peuvent servir à mesurer, par comparaison, la virulence de chacun des trois vaccins, d'âge correspondant, qui proviennent de la génisse en expérience.

Dans ce but, l'un de nous, médecin d'un dispensaire pour enfants, fait, avec les précautions convenables, par trois piqûres à chaque bras, des inoculations à de jeunes enfants non vaccinés : il leur inocule, au bras *droit*, l'un des trois vaccins normaux, et immédiatement leur inocule, au bras *gauche*, le vaccin d'âge correspondant, recueilli sur la génisse en expérience, et dont il s'agit de mesurer la virulence.

Cinq enfants sont inoculés : à droite avec du vaccin normal de *quatre* jours, à gauche avec le vaccin de *quatre* jours provenant de la génisse en expérience.

De même huit autres enfants sont inoculés avec les vaccins de *cinq* jours et sept autres avec les vaccins de *six* jours.

1. Nous renvoyons à notre premier mémoire pour tous les détails concernant le vaccin employé, dans nos expériences, aux inoculations sous-cutanées et sous-épidermiques.

Chez tous ces enfants, les inoculations donnent naissance à de belles vésicules vaccinales, sans différence notable d'aspect entre les vésicules du bras droit et celles du bras gauche.

Il n'existe donc pas non plus de différence appréciable entre la virulence des trois vaccins normaux et celle des trois vaccins, d'âge correspondant, recueillis sur la génisse en expérience.

En résumé, l'éruption vaccinale d'une génisse inoculée sous l'épiderme par de multiples incisions, *trois jours* après avoir reçu du vaccin dans le tissu cellulaire sous-cutané :

1^o apparaît dans les délais habituels ;

2^o est tout à fait normale d'aspect ;

3 ^o contient un lympho	$\left\{ \begin{array}{l} \text{de virulence normale, quatre} \\ \text{— — cinq} \\ \text{— — six} \end{array} \right\}$	jours après
		les inoculations
		sous-épidermiques.

EXPÉRIENCE XI *bis*.

INOCULATION VACCINALE SOUS-CUTANÉE PRÉCÉDANT DE *quatre* JOURS LES
INOCULATIONS SOUS-ÉPIDERMQUES

Une génisse, qui n'a pas quitté l'étable d'isolement de la rue Caulaincourt, reçoit, en injection sous la peau du flanc gauche, tout le contenu d'un gros tube à vaccin, rempli de pulpe glycinée préparée depuis deux mois et demi.

Quatre jours après, cette génisse est inoculée sous l'épiderme, au côté droit du tronc, par 157 incisions, avec du vaccin éprouvé.

A la même heure, une génisse témoin, qui n'a rien reçu sous la peau, est inoculée semblablement sous l'épiderme, aux deux côtés du tronc, par de multiples incisions, avec le même vaccin.

Chez ces deux animaux, l'éruption vaccinale apparaît et évolue très différemment. Le 15 janvier, trois jours après les inoculations sous-épidermiques, la génisse témoin ne présente, au niveau des incisions, non seulement aucun soulèvement épidermique, mais encore aucun épaissement du derme, aucune rougeur, en un mot aucune réaction ; elle est encore à la période d'incubation.

Au même moment, la génisse en expérience, au contraire, présente une éruption manifestement prématurée, plus avancée même en son évolution que ne l'est l'éruption d'un autre animal, vacciné 24 heures plus tôt. Sur la génisse en expérience, toutes les incisions sont entourées d'une aréole d'un rose très vif, indice d'une forte congestion ; le derme sous-jacent est infiltré au point de former une saillie très appréciable à la vue et au palper ; enfin, au pourtour d'un grand nombre d'incisions, l'épiderme est soulevé, les vésicules vaccinales commencent à apparaître.

Six jours après les inoculations sous-épidermiques, l'éruption de la génisse en expérience se compose de pustules larges, saillantes, tendues, remplies d'un liquide opaque et entourées d'une zone congestive d'un rose

vif; cependant plusieurs inoculations ont partiellement ou même totalement avorté. Ces pustules sont, pour la plupart, remarquables surtout par leurs contours festonnés et polycycliques : c'est l'indice certain que beaucoup des germes inoculés ne se sont pas développés et que chaque pustule est formée par la réunion d'un petit nombre seulement de colonies sous-épidermiques, trois ou quatre environ. Sur la génisse témoin, les éléments éruptifs sont bien moins larges, bien moins saillants, remplis pour la plupart d'un liquide encore transparent, quelques-uns cependant d'un liquide opaque, sans teinte congestive à la périphérie; ils ont des contours réguliers, nettement rectilignes et ne paraissant pas formés, comme ceux de la génisse en expérience, par la confluence de trois ou quatre vésicules primitivement arrondies.

Sur la génisse en expérience, on fait successivement, à 24 heures d'intervalle, trois récoltes de lymphes vaccinales : on recueille et on prépare, sous forme de pulpe glycerinée, du vaccin datant de *quatre* jours, de *cinq* jours et de *six* jours après les inoculations sous-épidermiques.

Pour mesurer la virulence de chacun de ces trois vaccins, on emploie, comme terrain de culture, la peau de jeunes enfants non vaccinés qu'on inocule par trois piqûres à chaque bras et, comme terme de comparaison, un vaccin éprouvé, recueilli sur une autre génisse, six jours après la vaccination sous-épidermique, comme il est de règle à l'établissement vaccinal de la rue Ballu; ce dernier vaccin est désigné sous le nom de vaccin normal.

Six enfants sont inoculés : à droite avec le vaccin *normal*, à gauche avec le vaccin de *quatre* jours provenant de la génisse en expérience.

De même quatre enfants sont inoculés avec les vaccins de *cinq* jours; quatre avec les vaccins de *six* jours.

Chez tous ces enfants, les inoculations donnent naissance à de belles vésicules vaccinales, sans différence notable d'aspect entre les vésicules du bras droit et celles du bras gauche.

Il n'existe donc pas non plus de différence appréciable entre la virulence du vaccin normal et celle des trois vaccins recueillis sur la génisse en expérience.

Tout au plus faut-il noter que, parmi ces trois vaccins, le vaccin de *quatre* jours a donné naissance à des vésicules particulièrement larges et saillantes, plus belles que les vésicules provenant, chez les mêmes sujets, du vaccin normal.

En résumé, l'éruption vaccinale d'une génisse inoculée sous l'épiderme par de multiples incisions, *quatre* jours après avoir reçu du vaccin dans le tissu cellulaire sous-cutané :

- 1° apparaît en avance de 24 heures au moins, sur les délais habituels;
- 2° est légèrement modifiée dans son aspect extérieur;

3° contient un lymphocyte { de virulence très accentuée, *quatre* { jours après
normale, *cinq* { les inoculations
six { sous-épidermiques.

EXPÉRIENCE XII *bis*.

INOCULATION VACCINALE SOUS-CUTANÉE PRÉCÉDANT DE *cinq* JOURS LES INOCULATIONS SOUS-ÉPIDERMiques

Une génisse, qui n'a pas quitté l'étable d'isolement de la rue Caulaincourt, reçoit, en injection sous la peau du flanc droit, tout le contenu d'un gros tube à vaccin, rempli de pulpe glycinée, préparée depuis deux mois et demi, dont on vient d'éprouver la virulence.

Cinq jours après, cette génisse est inoculée sous l'épiderme, par 128 incisions au côté droit et 87 incisions au côté gauche, avec du vaccin éprouvé.

À la même heure, une génisse témoin, qui n'a rien reçu sous la peau, est inoculée semblablement sous l'épiderme avec le même vaccin.

Chez ces deux animaux, l'éruption vaccinale apparaît et évolue très différemment. Elle se montre avec l'aspect normal, dans les délais habituels, chez la génisse témoin. Sur la génisse en expérience, elle est en avance, d'un jour, dans son apparition, et se présente avec un aspect très modifié qui témoigne d'un notable arrêt de développement des éléments éruptifs. Six jours après les inoculations sous-épidermiques, son aspect est le suivant : au côté gauche, sur 87 incisions, 12 n'ont été le siège d'aucun soulèvement épidermique, les inoculations y sont demeurées stériles; 26 seulement ont donné naissance, en un ou deux points de leur étendue, à des vésicules rudimentaires et avortées; pour le reste de l'éruption, 15 vésicules environ sont normales, les autres sont remarquables par leur contour irrégulier et polycyclique; comme le vaccin inoculé n'a cultivé qu'en quelques points seulement et non dans toute la longueur de l'incision, elles sont en réalité formées par la confluence d'un petit nombre de vésicules arrondies, disposées en chapelet sur une même ligne. Au côté droit, l'éruption est encore plus modifiée; sur 128 inoculations, 33 sont demeurées tout à fait stériles, 50 n'ont donné naissance qu'à une ou deux pustules rudimentaires et avortées, quatre ou cinq vésicules, au plus, sont normales, toutes les autres ont un contour nettement polycyclique, indice indirect de l'avortement d'un grand nombre des germes inoculés.

Sur la génisse en expérience, on fait successivement, à 24 heures d'intervalle, deux récoltes de lymphé vaccinale : on recueille et on prépare, sous forme de pulpe glycinée, du vaccin datant de *cinq* jours et de *six* jours après les inoculations sous-épidermiques.

Sur la génisse témoin, on recueille seulement du vaccin de *six* jours, on le considère comme du vaccin normal.

Pour mesurer la virulence des deux vaccins provenant de la génisse en expérience, on les inocule, par trois piqûres, au bras *gauche* de jeunes enfants non vaccinés qui reçoivent immédiatement, au bras *droit*, par trois piqûres également, le vaccin normal provenant de la génisse témoin.

Trois enfants sont inoculés avec les vaccins de *cinq* jours.

Chez ces trois enfants, toutes les inoculations donnent naissance à de belles vésicules vaccinales, sans différence notable d'aspect entre les vési-

cules du bras droit et celles du bras gauche. Il n'existe donc pas non plus de différence appréciable entre la virulence de ces deux vaccins.

Quatre autres enfants sont inoculés de même avec des vaccins de *six* jours.

Chez un seul de ces quatre enfants, il n'existe pas de différence entre les vésicules du bras droit et celles du bras gauche; chez les trois autres, au contraire, tandis que les inoculations du bras droit donnent naissance à de belles vésicules vaccinales, celles du bras gauche engendrent des vésicules moins grandes de moitié et qui apparaissent plus tardivement; encore deux de ces enfants ne présentent-ils, au bras gauche, que deux vésicules seulement, la troisième inoculation étant demeurée tout à fait stérile.

Il existe donc une notable différence entre la virulence du vaccin normal et celle du vaccin de *six* jours provenant de la génisse en expérience : ce dernier ne possède plus qu'une virulence manifestement atténuée.

Les différences ainsi constatées, par l'inoculation à de jeunes enfants, entre la virulence du vaccin de *cinq* jours et la virulence de vaccin de *six* jours, de même provenance, sont confirmées par l'inoculation de ces deux vaccins à des génisses.

Deux génisses qu'on vient d'inoculer, aux côtés du tronc, par de multiples incisions, avec du vaccin normal, sont, aussitôt après, inoculées à la région mammaire droite, par 15 incisions, la première avec le vaccin de *cinq* jours provenant de l'animal en expérience, la seconde avec le vaccin de *six* jours, de même provenance. Au bout d'un septenaire, tandis que l'éruption des côtés du tronc est normale chez les deux génisses, il existe une notable différence entre l'éruption de la région mammaire chez l'une et chez l'autre : la première, inoculée avec le vaccin de *cinq* jours, présente des vésicules d'aspect normal : la seconde, au contraire, inoculée avec le vaccin de *six* jours, ne porte, au niveau des incisions, que des vésicules partielles, rudimentaires, manifestement arrêtées dans leur développement.

En résumé, l'éruption vaccinale d'une génisse inoculée sous l'épiderme par de multiples incisions, *cinq* jours après avoir reçu du vaccin dans le tissu cellulaire sous-cutané :

1^o apparaît en avance de 24 heures au moins sur les délais habituels;

2^o est notablement modifiée dans son aspect extérieur et arrêtée dans son développement;

3^o contient une lymphé $\left\{ \begin{array}{l} \text{de virulence normale, } \textit{cinq} \\ \text{de virul. très atténuée, } \textit{six} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{jours après} \\ \text{les inoculations} \\ \text{sous-épidermiques.} \end{array}$

EXPÉRIENCE XIII bis.

INOCULATION VACCINALE SOUS-CUTANÉE PRÉCÉDANT DE *six* JOURS LES INOCULATIONS SOUS-ÉPIDERMQUES

Une génisse reçoit, à l'étable d'isolement de la rue Caulaincourt, en injection sous la peau du flanc droit, tout le contenu d'un gros tube à vaccin rempli de pulpe glycinée, préparée depuis deux mois.

Six jours après, cette génisse est inoculée sous l'épiderme par de multiples incisions, avec du vaccin de même provenance que celui qui a servi à l'inoculation sous-cutanée.

A la même heure, une génisse témoin, qui n'a rien reçu sous la peau, est inoculée semblablement sous l'épiderme avec le même vaccin.

Tandis que chez la génisse témoin, l'éruption vaccinale apparaît dans les délais habituels et suit son cours normal, elle se montre plus précoce dans son apparition sur la génisse en expérience et s'arrête aussi beaucoup plus rapidement : cinq jours après les inoculations sous-épidermiques, les vésicules vaccinales, très incomplètement développées, commencent à se dessécher ; le lendemain elles sont remplacées par des croûtes qui recouvrent les incisions dans toute leur longueur ou seulement en quelques points de leur étendue, car en beaucoup d'autres points les inoculations ont avorté, un grand nombre d'incisions est même demeuré tout à fait stérile.

Sur la génisse en expérience, on fait successivement, à 24 heures d'intervalle, deux récoltes de lymphes vaccinales : on recueille et on prépare sous forme de pulpe glycérinée du vaccin datant de *quatre* jours et de *cinq* jours après les inoculations sous-épidermiques.

Pour mesurer la virulence de ces deux vaccins, on les inocule par trois piqûres au bras *gauche* de jeunes enfants non vaccinés qui reçoivent immédiatement, au bras *droit*, par trois piqûres également, du vaccin normal.

Quatre enfants sont ainsi inoculés avec les vaccins de *quatre* jours.

Chez ces quatre enfants, toutes les inoculations du bras droit faites avec le vaccin normal donnent naissance à de très belles vésicules vaccinales. Par contre, deux enfants ne présentent, au bras gauche, aucune réaction, si légère soit-elle ; le troisième porte, au bras gauche, une seule petite vésicule qui, en se desséchant, forme une croûte d'un diamètre moitié moindre que les croûtes du bras droit ; enfin le quatrième porte, au bras gauche, deux petites vésicules, le diamètre des croûtes qu'elles forment en se desséchant atteint pour l'une 5 millimètres, et pour l'autre 2 millimètres seulement, tandis que le diamètre des croûtes du bras droit mesure au moins un centimètre.

Il existe donc une très grande différence entre la virulence d'un vaccin normal et celle du vaccin de *quatre* jours provenant de la génisse en expérience : ce dernier ne possède plus qu'une virulence presque nulle.

Trois autres enfants sont inoculés de même avec les vaccins de *cinq* jours.

Un de ces enfants n'est pas revu, les deux autres présentent au bras droit chacun trois belles vésicules vaccinales et n'offrent au bras gauche aucune réaction, si légère soit-elle.

La virulence du vaccin de *cinq* jours provenant de la génisse en expérience semble donc tout à fait nulle.

En résumé, l'éruption vaccinale d'une génisse inoculée sous l'épiderme par de multiples incisions, *six jours* après avoir reçu du vaccin dans le tissu cellulaire sous-cutané :

1^o apparaît en avance de 24 heures environ sur les délais habituels ;
 2^o est très modifiée dans son aspect extérieur, rapidement et notablement arrêtée dans son développement ;

3^o contient une lymphe $\left\{ \begin{array}{l} \text{de vir. presque nulle, quatre} \\ \text{tre} \\ \text{de virulence nulle, cinq} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{jours après} \\ \text{les inoculations} \\ \text{sous-épidermiques.} \end{array}$

EXPÉRIENCE XIV bis.

INOCULATION VACCINALE SOUS-CUTANÉE PRÉCÉDANT DE sept JOURS
 LES INOCULATIONS SOUS-ÉPIDERMQUES

Une génisse reçoit à l'étable d'isolement de la rue Caulaincourt, en injection sous la peau du flanc droit, tout le contenu d'un gros tube à vaccin rempli de pulpe glycinée, préparée depuis deux mois.

Sept jours après, cette génisse est inoculée sous l'épiderme, par de multiples incisions, avec du vaccin de même provenance que celui qui a servi à l'inoculation sous-cutanée.

A la même heure, une génisse témoin, qui n'a rien reçu sous la peau, est inoculée semblablement sous l'épiderme, avec le même vaccin.

Tandis que, chez la génisse témoin, l'éruption vaccinale apparaît dans les délais habituels et suit son cours normal, elle se montre plus précoce dans son apparition sur la génisse en expérience, au moins au niveau de quelques incisions, car le plus grand nombre demeure stérile et les éléments éruptifs incomplets, partiels, rudimentaires se dessèchent encore plus rapidement que dans l'expérience précédente.

Sur la génisse en expérience on fait successivement, à 24 heures d'intervalle, deux récoltes de lymphe vaccinale : on recueille et on prépare, sous forme de pulpe glycinée, du vaccin datant de quatre jours et de cinq jours après les inoculations sous-épidermiques.

Pour mesurer la virulence de ces deux vaccins, on les inocule par trois piqûres au bras gauche de jeunes enfants non vaccinés qui reçoivent immédiatement, au bras droit, par trois piqûres également, du vaccin normal.

Chez quatre enfants, ainsi inoculés avec les vaccins de quatre jours, toutes les inoculations du bras droit donnent naissance à de très belles vésicules vaccinales. L'un des enfants présente, au bras gauche, trois petites taches qui disparaissent rapidement, sans avoir abouti à la formation de vésicules ; les trois autres enfants n'offrent, au bras gauche, aucune réaction appréciable.

La virulence du vaccin de quatre jours provenant de la génisse en expérience est donc pour ainsi dire nulle.

Trois autres enfants, inoculés de même avec les vaccins de cinq jours présentent, au bras droit, de très belles vésicules vaccinales tandis que leur bras gauche n'est le siège d'aucune réaction.

La virulence du vaccin de cinq jours provenant de la génisse en expérience est donc tout à fait nulle.

renfermer une lymphé qui n'est plus inoculable. Tout au contraire, le virus vaccinal, préventivement inoculé sur la peau, agit sur la morphologie des éléments éruptifs d'une façon plus précoce que sur la virulence de leur contenu : des vésicules d'aspect rudimentaire et comme avorté peuvent renfermer une lymphé de virulence encore normale.

Le fait principal mis en lumière par ces nouvelles recherches, c'est que, chez les génisses successivement inoculées sous la peau et sous l'épiderme avec du virus vaccinal, il s'écoule, entre la vaccination sous-cutanée et la complète disparition de la virulence du vaccin sous-épidermique, un intervalle d'au moins *onze à douze* jours.

Nous avons répété ces expériences sur une autre espèce animale, sensible à l'inoculation du vaccin, sur le cochon. Six jeunes cochons ont reçu, sous la peau, chacun tout le contenu d'un gros tube à vaccin; 24 heures après, un de ces animaux a été inoculé sous l'épiderme par de multiples incisions, le lendemain un autre a été semblablement inoculé; le surlendemain un troisième et ainsi de suite jusqu'au dernier, de telle sorte que nous avons pu observer les résultats de l'inoculation vaccinale sous-épidermique, précédée, à un, deux, trois, quatre, cinq et six jours d'intervalle, par une inoculation sous-cutanée.

Nous ne rapporterons pas ces expériences en détail : les résultats furent très analogues à ceux que nous avons observés chez la génisse, avec cette différence toutefois que, chez le cochon, *six* jours après la vaccination sous-cutanée (au lieu de *huit* jours chez la génisse), toutes les inoculations sous-épidermiques demeurèrent stériles, et qu'il s'écoula entre la vaccination sous-cutanée et la complète disparition de la virulence du vaccin sous-épidermique un intervalle de *neuf à dix* jours seulement (au lieu de *onze à douze* jours chez la génisse).

En résumé, chez le cochon, ces deux phénomènes, l'immunité caractérisée par la résistance de la peau à de nouvelles inoculations d'une part, et la disparition de la virulence du contenu des éléments éruptifs d'autre part, apparaissent environ deux jours plutôt que chez la génisse.

Ce sont des faits sur lesquels nous aurons, dans un prochain mémoire, occasion de revenir.

NOTE SUR LA CONTAGIOSITÉ DE LA PESTE BOVINE AU PORC

PAR MM. CARRÉ ET FRAIMBAULT

Études faites à l'Institut Pasteur de Nha-Trang.

Au cours de nos recherches sur la peste bovine en Indo-Chine, on nous avait signalé à plusieurs reprises une assez grande mortalité des porcs, dans les régions contaminées.

Toutefois, nous n'avions pas attaché une grosse importance à ce renseignement, la peste bovine ayant toujours été considérée comme une maladie absolument spéciale aux ruminants. D'autre part, les maladies contagieuses du porc sont fréquentes et souvent difficiles à différencier ; nous avons pensé qu'il s'agissait de deux affections simplement concomitantes. Enfin, à en croire les Annamites, pendant les épizooties de peste bovine, tous les animaux domestiques : chiens, chats, poules, seraient atteints, ce qui est peu vraisemblable. Nous avons pu maintes fois nous convaincre du contraire.

Plusieurs missionnaires cependant nous avaient déclaré que la mortalité des porcs et des bœufs coïncidait absolument avec les fréquentes invasions de la peste bovine en Indo-Chine.

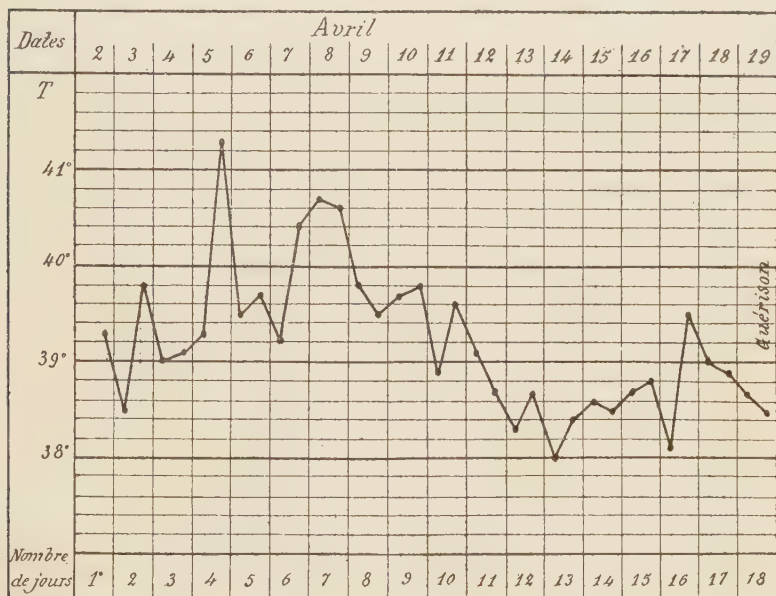
Au cours de l'épizootie de 1897-98, qui fit de si grands ravages au Tonkin et dans le nord de l'Annam, notre camarade Camboulives nous signala de son côté la mortalité énorme des porcs dans les régions infectées par la peste bovine ; il croyait à la réceptivité du porc pour cette maladie.

D'autre part, la constatation de la peste bovine chez le pécari, en 1866, par M. Leblanc, pouvait préparer l'esprit à admettre la possibilité de la contamination du porc, le pécari se trouvant en quelque sorte le trait d'union entre les bovins et les porcins. En relisant Friedberger et Fröhner, nous remarquons aussi que Penning aurait signalé la transmission de la peste bovine au sanglier, mais nous ignorons les détails de cette observation.

Dès notre retour à Nha-Trang, nous avons institué une série d'expériences qui nous permettent d'affirmer la contagiosité de la peste bovine au porc.

Nous nous bornerons à relater une de nos séries d'expériences : elle montre de la façon la plus évidente la transmissibilité de la maladie du bœuf au porc, du porc au porc et du porc au bœuf.

Trois porcelets de 3 mois environ (n^{os} 6, 7 et 8) reçoivent en injection sous-cutanée chacun 2 c. c. du sang frais, défibriné, d'un veau atteint de peste et réagissant thermiquement depuis deux jours.

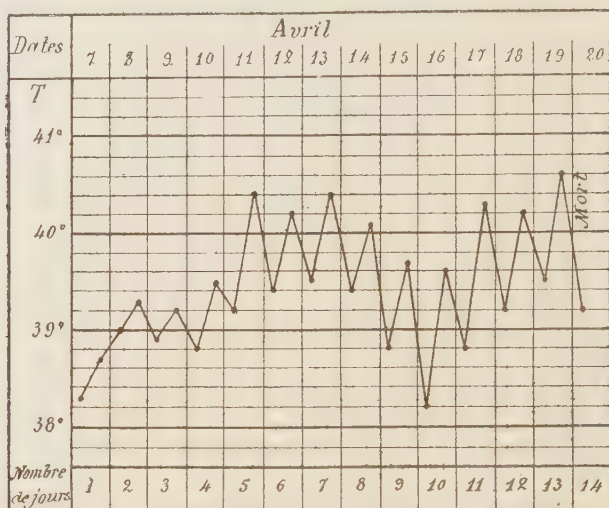


Porcelet n^o 6. — 2 avril, inj. sous-cutanée. — 8, mange peu. — 9, triste, tremblements. — 12, mange bien, état normal. Maladie bénigne.

Tous trois présentent le 4^e jour une hyperthermie considérable (41°, 3, 40°, 8, 40°, 7) ; ils cessent de manger, deviennent tristes, sont pris de frissons, leurs yeux sont châtieux, ils vomissent souvent et ont une abondante diarrhée jaune très liquide. Le 6^e jour on sacrifie l'un d'eux (le n^o 8) pour obtenir une quantité de sang assez notable, destinée aux expériences ultérieures. Les deux autres guérissent après avoir été malades huit à dix jours.

Trois autres porcelets, achetés en même temps, étaient conservés comme témoins ; leur température était prise journellement. Ils servirent aux inoculations ultérieures. Il va sans dire qu'ils ne présentèrent rien d'anormal avant leur inoculation.

Le sang du porc sacrifié sert à inoculer un autre porc (n° 10, 2^e passage) et un veau (n° 55). Tous deux contractent une maladie assez rapidement mortelle. Le veau succombe à une peste absolument typique treize jours après l'inoculation. Le porc,



Veau n° 55. — 7 avril, inoc. sous-cut. de 5 c. c. de sang frais. — 12, ne mange pas. — 17, diarrhée. — 18, maigrir. — 20, mort. — Autopsie : Emphysème pulmonaire, épanchement de sérosité citrine dans l'abdomen ; péritoine injecté ; iléon t. enflammé, couvert de membranes diphtéritiques grisâtres ; cæcum et gros côlon t. enflammés, ecchymoses d'un rouge sombre sur le côlon flottant.

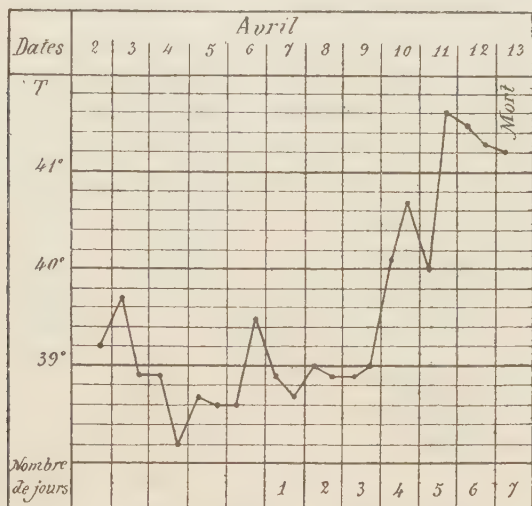
qui commence à réagir thermiquement le 4^e jour après l'inoculation, de même que le veau meurt le 7^e jour et présente à l'autopsie des lésions assez caractéristiques sur lesquelles nous reviendrons plus loin.

Ce porc sert à deux séries d'inoculations : 1^o il est saigné — par la section de la queue — le 2^e jour de sa réaction thermique. Avec les quelques gouttes de sang obtenues, on inocule un porc (n° 9, 3^e passage), qui commence le 5^e jour à réagir thermiquement, et meurt le 9^e jour sans avoir présenté des températures

très élevées, mais avec les symptômes cliniques des précédents.

Du sang recueilli une heure après la mort du n° 9 permet d'inoculer le n° 15 (4^e passage) qui prend une maladie mortelle et dont le sang donne une peste grave au n° 18 (5^e passage).

2° Au moment de la mort du porc n° 10, on recueille dans le cœur un demi-centimètre cube de sang qui, après dilution dans 5 c. c. d'eau stérilisée, est injecté sous la peau du porc n° 14 (3^e passage). La réaction thermique apparaît le 6^e jour



Porcelet n° 10. — 7 avril, inj. sous-cutanée au pli de l'aîne. — 11, saignée. — 12, diarrhée jaune, vomissements. — 13, mort. — Autopsie : ulcér. sup. sur les lèvres. Forte inflammation de l'estomac et des parties moy. et terminale de l'intestin grêle, avec ulcér. sup. Desquamations épithéliales étendues sur le cæcum et le côlon. Foie congestionné par places, bleuâtre par places.

après l'injection ; l'animal est très malade pendant une dizaine de jours, puis se rétablit.

Le 3^e jour de sa réaction thermique, on obtient, par la section de la queue, une dizaine de gouttes de sang que l'on injecte au porc n° 16 (4^e passage).

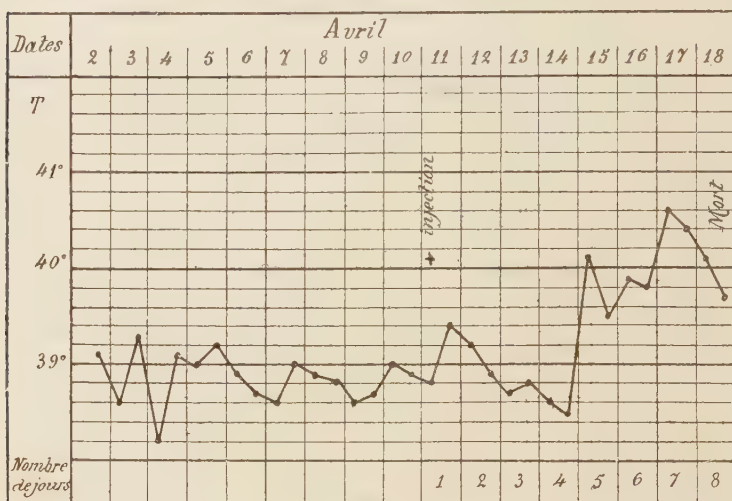
La réaction thermique se manifeste, chez ce dernier, le 6^e jour, la maladie évolue lentement, et l'animal guérit au bout d'une vingtaine de jours.

Le porc n° 16, saigné le 3^e jour de sa réaction thermique, donne 6 gouttes de sang qui servent à inoculer dans la trachée

le veau n° 72 ; il prend une peste caractéristique dont il meurt au bout de 16 jours.

En résumé, 2 centimètres cubes de sang virulent d'un veau ont donné une maladie qui a été transmise pendant 5 passages successifs dans l'organisme du porc, et qui, après le premier et le 4^e passages, donne une peste mortelle pour le veau, à la dose de 6 gouttes dans le dernier cas.

De nombreuses expériences nous ont en outre montré la contagiosité de la maladie par contact de porc à porc. L'infection



Porcelet n° 9. — Le 11 avril, inj. sous-cut. de 3 g. de sang du porcelet n° 10. — 17, vomissements. — 18, frissons, diarrhée. — 19, mort. Autopsie : cong. t. acc. du poumon ; vive inflammation de la muq. stomacale et de l'intestin grêle, du cæcum, du gros côlon et de la 1^e p. du côlon flottant ; congestion des plaques de Peyer ; foie congestionné, presque noir.

semble être d'un jour ou deux plus tardive par ce mode de contamination que par l'injection sous-cutanée.

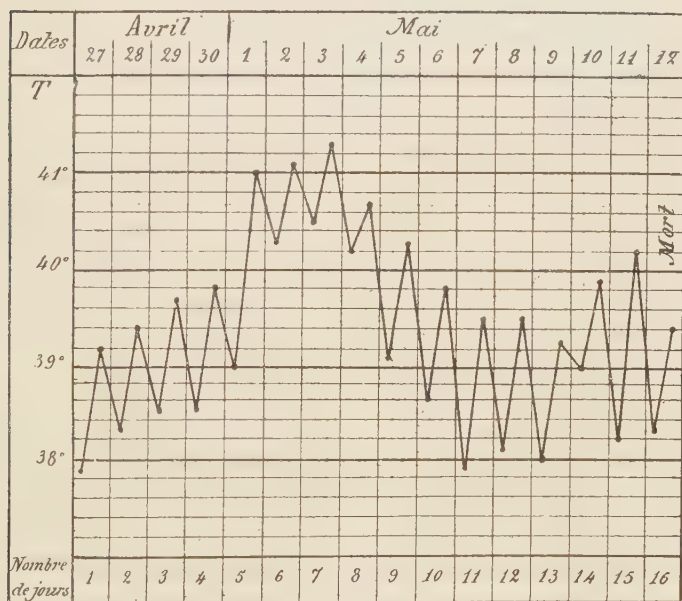
Nous aurions voulu également établir expérimentalement la transmissibilité par contact de la maladie du veau au porc et du porc au veau. Des difficultés matérielles, provenant de notre installation, nous ont fait remettre à une date ultérieure ces recherches complémentaires.

Symptômes de la peste bovine chez le porc. — Ils ne sont pas très caractéristiques, et ressemblent un peu à ceux que l'on observe dans la plupart des septicémies hémorragiques.

Dès le début, l'animal est triste, mange à peine et vomit souvent; très rapidement les matières vomies sont teintées en jaune verdâtre par la bile.

Des frissons apparaissent à peu près constamment à cette période.

Les yeux deviennent châssieux.



Veau n° 72. — 27 avril, inj. dans la trachée de 6 gouttes de sang du porc n° 16 (4^e passage). — 3 mai, mange peu. — 5, diarrhée, maigrit. — 10, étique, reste couché. — 12, mort. — Autopsie : feuillet très dur, nomb. pétéchies sur 1^{re} p. de la caillotte et ulcérations sur la partie pylorique; follicules clos indurés, volumineux. Plaques de Peyer peu altérées. Ouverture iléo-cæcale noire; trainées noirâtres sur la muqueuse du cæcum et du colon flottant. Poumon emphysémateux.

Très souvent aussi, on remarque de la salivation, de l'écume sur les lèvres, et l'examen de la bouche fait constater des desquamations sur les muqueuses labiale et linguale.

La diarrhée survient ordinairement le deuxième jour de l'hyperthermie. Elle est jaune, de plus en plus liquide. Jamais nous ne l'avons trouvée striée de sang.

Dans les cas rapidement mortels, tous les symptômes évoluent très vite, et l'animal ne tarde pas à refuser toute nourri-

ture et à être épuisé par les vomissements et l'abondance de la diarrhée.

Si l'animal doit guérir, on voit d'abord les vomissements cesser, l'appétit revenir : la diarrhée est le symptôme le plus persistant, et dure parfois 10 à 12 jours.

Diagnostic différentiel. — Ces symptômes pourraient, à la rigueur, suffire pour diagnostiquer la maladie dans une région atteinte de peste bovine.

Nous devons avouer toutefois qu'ils sont assez peu significatifs. — La contagiosité, l'évolution de la maladie pourraient la faire confondre avec le rouget ou la pneumo-entérite.

À l'autopsie, on ne retrouve pas les altérations des séreuses qui accompagnent presque toujours la pneumo-entérite; d'autre part, les lésions intestinales sont plus nettes que dans le rouget.

L'examen bactériologique, les cultures permettront aussi de les différencier : l'examen microscopique, les divers moyens de culture actuellement connus ne donnent pas de résultats positifs pour la peste bovine.

Mais c'est surtout l'inoculation simultanée au pigeon, au lapin et au cobaye qui permettra de voir à laquelle des affections contagieuses du porc on a affaire. Si c'est du rouget, le pigeon mourra en 3 ou 5 jours, le lapin du 4^e au 8^e jour; si c'est de la pneumo-entérite, le pigeon restera indemne : le cobaye et le lapin succomberont en 4 ou 8 jours (Nocard et Leclainche).

Enfin, l'inoculation de quelques gouttes de sang au veau permettra de constater de l'hyperthermie le 4^e jour et les symptômes cliniques de la peste bovine vers le 7^e ou le 8^e jour.

Lésions. — Souvent, la rapidité d'évolution de la maladie ne laisse pas au sujet le temps de maigrir, mais dès que l'affection se prolonge, l'émaciation ne tarde pas à se produire et l'animal « fond » très vite.

Au moment de la mort, on peut constater des taches ecchymotiques sous-cutanées sur le groin, l'extrémité des membres et la paroi pectoro-abdominale. Dans deux cas nous avons pu constater une sorte d'éruption pustuleuse.

C'est sur l'appareil digestif que les lésions sont les plus accusées.

Presque constamment, on trouve une desquamation épi-

théliale de la muqueuse buccale, et même des ulcérations au niveau des gencives et des lèvres.

L'arrière-bouche est parfois enflammée, mais ce n'est pas la règle.

L'estomac est toujours le siège de lésions très intenses : souvent l'inflammation s'étend à toute la muqueuse stomacale, mais toujours la partie pylorique présente des ulcérations plus ou moins profondes, allant du diamètre d'une pièce de 50 centimes à celui d'une pièce de cinq francs. Suivant l'âge de la lésion, tantôt il y a une simple mortification de la muqueuse, assez superficielle ; tantôt et plus souvent la muqueuse a disparu complètement, laissant le derme recouvert d'une sorte de fausse membrane diphthérique. Le contenu de l'estomac est liquide, souvent teinté en jaune par la bile qui reflue dans cet organe pendant les efforts de vomissement.

L'inflammation de l'intestin grêle n'est pas constante ; elle est presque toujours beaucoup moins intense que celles de l'estomac et du gros intestin. Les lésions sont plus accusées sur la portion terminale de l'iléon ; la plaque de Peyer très étendue, qui se trouve dans cette région, est très enflammée, parfois ulcérée, et donne à cette partie du tube intestinal une rigidité particulière.

Le cæcum surtout et le gros intestin, d'une manière générale, sont le siège d'une vive inflammation. Souvent même on voit sur le cæcum des ulcérations aussi accusées au moins que celles de l'estomac.

Le foie a parfois une teinte assez foncée ; d'autres fois il est décoloré. — La bile est généralement épaisse, souvent grumeleuse ; les reins sont rouges, congestionnés, l'urine fortement teintée par des globules sanguins.

Le péritoine est souvent un peu rouge, sans présenter d'exsudat.

Les ganglions mésentériques sont presque toujours volumineux et parfois noirs, violacés.

L'appareil respiratoire est fréquemment atteint. Les premières voies sont généralement indemnes. Une fois ou deux seulement, nous avons noté un peu d'inflammation du larynx. La congestion pulmonaire, au contraire, existe assez régulièrement et souvent nous avons observé des îlots de pneumonie.

L'emphysème pulmonaire est fréquent, mais non presque constant comme chez le bœuf. Jamais nous n'avons constaté d'exsudat pleural.

L'examen du sang, du foie, de la rate ne nous a jamais montré aucun microorganisme spécifique. Nous avons eu le même résultat négatif avec nos cultures.

Ces premières recherches nous ont paru présenter un certain intérêt, en raison du danger, d'autant plus grand qu'il est ignoré, de l'introduction possible de la peste bovine par les porcs.

Par des études ultérieures, nous nous efforcerons de déterminer, aussi exactement que possible, la durée de la virulence soit chez les pores convalescents de peste bovine, soit dans la viande conservée par les divers procédés.

De précédentes observations nous permettent de croire que l'agent du contagium se conserve pendant un laps de temps assez court, qui ne dépasserait pas une quinzaine de jours, au moins dans nos possessions d'extrême-Orient.

Nous tenons à déclarer aussi que nos expériences ont été faites sur des porcs annamites, et que nous ignorons si la réceptivité des porcs de race celtique pour la peste bovine est moindre ou plus grande.

N. B. — Depuis la rédaction de cette note, une lettre de M. le Dr Delay, en mission en Chine, nous apprend que les Chinois sont également convaincus de la contagiosité de la peste bovine au porc, d'après un missionnaire, le P. Kircher, qui lui indique comme susceptible de contracter la peste, après les bovidés : 1^o le porc, 2^o le mouton, 3^o la chèvre.

Nos essais de contamination de la chèvre et du mouton nous ont donné des résultats presque négatifs qui feront l'objet d'une note ultérieure.

ÉTUDE SUR L'AGGLUTINATION COMPARÉE

DU VIBRION CHOLÉRIQUE ET DES MICROBES VOISINS

Par le sérum spécifique et par les substances chimiques,

Par J. BOSSAERT.

Le phénomène de l'agglutination des microbes, étudié d'abord au point de vue de son rôle dans l'immunité, a reçu ses plus importantes applications dans la diagnose des espèces microbiennes. Il semble même qu'à l'heure actuelle, le critérium le plus sûr¹ que l'on puisse invoquer en faveur de la nature typhique d'un bacille soit sa sensibilité agglutinative au typhus-sérum convenablement dilué.

En bactériologie pratique, c'est le sérum d'un animal fortement immunisé, soit contre la fièvre typhoïde, soit contre le choléra, que l'on emploie couramment pour la diagnose des microbes correspondants, dont la détermination est si importante dans une foule de recherches.

Mais l'agglutination des bacilles, au sein de leurs émulsions, peut être provoquée par d'autres moyens. M. Malvoz² a montré que certaines substances coagulantes, — la formaline, l'eau oxygénée, le sublimé, par exemple, — jouissaient de la propriété de provoquer, dans les émulsions en eau *distillée* de bacilles typhiques, la formation de beaux amas, comparables, par leur aspect, à ceux du typhus-sérum. La safranine et la vésuvine sont douées des mêmes propriétés. Blachstein³, de son côté, emploie la chrysoïdine, matière colorante diazoïque, comme agglutinant du vibrion cholérique. Certaines substances, telles que le sulfate

1. VAN DE VELDE, Valeur de l'agglutination dans la séro-diagnose de Widal et dans l'identification des bacilles éberthiformes. — *Centralblatt für Bakteriologie*, n° 42, 25 mars 1898.

2. MALVOZ, Recherches sur l'agglutination du bacillus typhosus par les substances chimiques, *Annales Pasteur*, juillet 1897.¹

3. *Centralblatt für Bakteriologie*, n° 3, vol. XXI, 1897.

ammonique¹, sont encore de bons agglutinants de certains microbes.

De plus, comme M. Malvoz l'a vu², l'agglutination des microbes se produit encore quand on les entraîne dans certains précipités : après émulsion du *bacillus typhosus* dans de l'eau riche en bicarbonate calcique, si l'on ajoute de la soude, les microbes se retrouvent en grands amas dans le précipité de carbonate calcique qui se forme dans ces conditions. Citons encore un récent travail de Nicolle³ : si l'on ajoute, non plus à une émulsion de microbes, mais au produit de la filtration d'une culture, une trace du sérum spécifique, il se forme dans le liquide des amas rappelant beaucoup les agglutinats ordinaires.

Les divers moyens de provoquer l'agglutination, autres que les procédés basés sur l'emploi des sérums spécifiques, peuvent-ils être utilisés en bactériologie analytique? En d'autres termes, donnent-ils des différences assez grandes pour servir au diagnostic?

En collaboration avec M. Lambotte⁴, j'ai montré que la formaline, une des substances étudiées par M. Malvoz, pouvait parfaitement servir au diagnostic du bacille typhique, en ce sens que ce dernier, *dans certaines conditions déterminées*, est fortement agglutiné par l'aldéhyde formique, tandis qu'un bon nombre d'échantillons de coli-bacilles, de microbes pseudo-typhiques, ne sont pas agglutinés. Certes, il ne s'agit pas d'identifier comme bacille typhique tout microbe en bâtonnet qui agglutine par la formaline; mais, tout au moins, un bacille qui ne subit pas cette action particulière de la formaline peut être considéré comme non typhique.

Je me suis proposé, dans le présent travail, de rechercher si, au point de vue du vibron cholérique et des autres microbes qui peuvent être confondus avec lui, il n'existe pas d'agents d'agglutination, autres que le sérum, utilisables en pratique.

Ces recherches sont devenues ainsi une étude comparée sur l'agglutination par les sérums et les substances chimiques,

1. Travail inédit de M. Malvoz.

2. *Annales Pasteur*, juillet 1897, page 536.

3. NICOLLE, Recherches sur la substance agglutinée, *Annales Pasteur*, mars 1898.

4. Recherches sur le diagnostic pratique de quelques microbes par les substances chimiques agglutinantes, *Bulletin de l'Acad. royale de médecine de Belgique*, 1897.

des spirilles cholériques et des microbes de la même famille naturelle.

J'ai utilisé, pour mes recherches, un microbe type du choléra, au moyen duquel j'ai immunisé fortement un animal. Le sérum de cet animal, recueilli au bout d'un certain temps, s'est montré doué de propriétés agglutinantes prononcées vis-à-vis du microbe cholérique.

J'ai étudié, pendant tout le cours de l'immunisation et à la fin de celle-ci, les propriétés de ce sérum, au point de vue de ses propriétés agglutinantes, sur le microbe lui-même ayant servi aux inoculations, sur d'autres microbes du choléra de diverses provenances, et sur les spirilles de Metchnikoff, de Finkler et de Deneke. J'ai recherché également les propriétés agglutinantes du lait, des organes et du sang du fœtus.

J'ai de même étudié la façon dont se comportent le vibrion du choléra vrai, et ceux de Metchnikoff, de Finkler, et de Deneke, vis-à-vis des agglutinants physico-chimiques.

§ 4. AGGLUTINATION PAR LE SÉRUM SPÉCIFIQUE

Je me suis servi, dans mes expériences, du sérum du sang d'une chèvre à laquelle j'injectais du bacille cholérique, en émulsion, sous la peau des flancs. Le microbe *choléra-Angleur*, qui a servi aux inoculations, est un microbe type du choléra dit asiatique; il a été isolé par M. Malvoz en 1894, lors de l'épidémie de Liège et environs.

Il est inutile, pour étudier le phénomène de l'agglutination, de se servir d'un microbe à virulence exaltée; Pfeiffer¹ le dit expressément dans son dernier travail.

Dans le but d'étudier les propriétés du sérum chez le fœtus ou le nouveau-né, on fit saillir la chèvre le 21 novembre 1897. — Du 26 novembre 1897 au 1^{er} avril 1898, la chèvre reçut environ 34 centimètres cubes d'émulsion dans l'eau de vibrions cholériques, tués soit par une température de 60°, soit par le chloroforme; ces émulsions étaient de plus en plus fortes, de sorte que, vers le mois de mars, la chèvre recevait, en une injection d'un centimètre cube, la valeur de 3 à 4 cultures sur gélose de choléra ensemencé depuis 2, 3, au maximum 4 jours.

1. PFEIFFER et MARX, Die Bildungstätte der Cholerascchutzstoffe, *Zeit. für Hygiène*, 21 avril 1898, page 275.

La chèvre avorta le 14 mars et donna un fœtus mâle d'environ quatre mois. A partir de ce jour, la sécrétion lactée s'établit et le lait fut également mis en expérience.

La façon dont j'ai opéré a toujours été la suivante : les émulsions de microbes sont faites dans l'eau distillée et non dans l'eau salée, car la présence de sels minéraux peut modifier les propriétés agglutinantes¹; des cultures, sur gélose inclinée, âgées de 24 heures environ, servent à faire ces émulsions. Je délaie une anse de l'enduit microbien dans un centimètre cube d'eau distillée. On s'assure, à chaque essai, de l'absence d'amas spontanés de vibrions dans ces émulsions.

Le sérum est également dilué avec de l'eau distillée.

Les préparations sont faites sur porte-objet à raison d'une anse d'émulsion pour une anse de sérum dilué. On les met sous cloche, en chambre humide, en attendant le moment où la réaction se produit.

Je considère comme ne donnant plus le phénomène de l'agglutination toute préparation dans laquelle il ne s'est même pas formé de commencement d'agglutination au bout de trois quarts d'heure.

J'appelle limite de l'agglutination la dilution pour laquelle le sérum ne donne plus qu'une très légère agglutination au bout du même temps.

I. — *Sérum maternel.*

Avant le commencement des inoculations, le sérum de la chèvre agglutinait le bacille cholérique à raison d'une partie de sérum pour 50 p. d'émulsion microbienne. Il avait donc un pouvoir agglutinant assez considérable vis-à-vis du vibron du choléra. Il en est de même, aux mêmes doses, vis-à-vis de divers bacilles cholériques vrais (choléra-Brest, choléra-Tunis, choléra-Guilvinec, choléra-Tilff, choléra-Vaux, choléra-Liège), et pour les vibrions de la famille naturelle du choléra (vibrions de Metchnikoff, de Finkler et de Deneke).

A la suite des inoculations sous-cutanées d'émulsions stérilisées de bacilles cholériques d'Angleur, le pouvoir agglutinant du sérum normal se mit à augmenter : j'ai fini par obtenir un

1. MALVOZ, *Loc. cit.*, *Annales Pasteur*, 1897.

sérum agglutinant le vibrion servant aux injections à la dose de 1 p. 1500.

Je n'ai pas poussé plus loin l'immunisation. Il m'a fallu pour cela injecter environ une centaine de cultures sur gélose dans l'espace de 4 mois. A ce moment, seul l'échantillon de bacille-virgule servant aux injections était agglutiné à 1 p. 1500. Pour les autres échantillons de choléra vrai, les proportions étaient différentes : de 1 p. 500, par exemple, pour le choléra-Tunis, de 1 p. 1000 pour le choléra-Guilvinec et le choléra-Tilff.

Quant aux vibrions de Metchnikoff, de Finkler et de Deneke, le chiffre était le même que pour le sérum normal, c'est-à-dire voisin de 1 p. 50.

En résumé, ces expériences confirment les faits connus que le sérum d'un animal fortement immunisé contre le choléra, quand il est suffisamment dilué, n'agglutine plus que le vibrion de Koch et même, à une dilution plus forte encore, que l'échantillon de choléra ayant servi aux inoculations¹.

II. — Sérum du fœtus.

J'ai étudié le sérum du fœtus de cette chèvre au point de vue des propriétés agglutinantes. Je l'ai emprunté au sang de la veine ombilicale, du foie, du cœur, des poumons.

Tandis qu'au moment de l'avortement le sérum maternel agglutinait à la dilution de 1 p. 1000 environ, le sérum des

1. Comme Besredka¹ l'a fait pour la toxine diphtérique, j'ai noté avant et après les injections vibrioniennes le nombre des globules blancs polynucléaires (colorateur du sang séché sur lamelle à l'éosine et au bleu de méthylène. Après chaque injection, le nombre de ces globules augmente notablement dès le lendemain, atteint son maximum après deux ou trois jours, puis diminue.

Exemple :

Avant l'injection, sur 400 leucocytes, il y a 4 polynucléaires : on injecte 1 c. c. d'émulsion de vibrions cholériques tués par le chloroforme :

Après 1 jour : Sur 400 globules.....	41	polynucléaires.
— 2 jours.....	62	—
— 4 jours.....	40	—
Nouvelle injection :		
Après 1 jour.....	43	—
— 2 jours.....	58	—
— 3 jours.....	53	—
— 5 jours.....	27	—
— 8 jours.....	15	—

1. *Annales Pasteur*, Leucocytose dans la diphtérie, n° 5, 1898.

diverses parties du fœtus présentait la même propriété à la dose de 1 p. 100 seulement. Si on se rappelle que le sérum normal de la chèvre n'agglutinait pas à plus de 1 p. 50, on peut affirmer qu'il y a un *faible passage* de la mère au fœtus des substances agglutinantes formées au cours de l'immunisation. On n'a pas trouvé de différence d'un organe à l'autre.

III. — *Lait de la chèvre immunisée.*

Tandis que l'urine de la chèvre fortement immunisée ne présentait le pouvoir agglutinatif qu'à un très faible degré, environ 1/50, le lait présentait ce pouvoir à un *haut degré*, voisin de celui du sérum du sang de l'animal : la réaction se montrait encore à 1/1000 et au delà, au moment des dernières injections.

A la différence du sang *normal*, le lait normal de chèvre n'a pas d'action agglutinante sur le vibron cholérique, pas plus que sur les spirilles de Metchnikoff, de Finkler et de Deneke.

Le lait de la chèvre *immunisée* ne se montra pas plus actif vis-à-vis de ces spirilles pseudo-cholériques. A 1/10 de lait de la chèvre immunisée, plus la moindre trace d'agglutination de ces derniers microbes. Remarquons, en passant, que la propriété agglutinante qui existe à l'état normal dans le sang de la chèvre ne se transmet pas aussi abondamment au lait que la propriété acquise par les injections cholériques.

Quant à la transmission du pouvoir agglutinatif aux petits par l'allaitement, cette question est encore controversée.

A défaut de chevreau, je pris comme sujets d'expérience un chien et une chatte. Les résultats peuvent avoir été contrariés par le fait que ces animaux supportaient très mal le lait de la chèvre immunisée; ils éprouvaient un dégoût profond à l'absorber et l'ingestion était suivie d'une forte diarrhée. Il y eut certainement transmission, mais dans une faible mesure, du pouvoir agglutinant au sang du chien en lui faisant prendre, par la voie gastro-intestinale, du lait agglutinant fortement. Le sang de chien normal donnait une très faible réaction agglutinante à 1/50; après l'ingestion de lait pendant un mois, on obtint une réaction des plus nettes à cette même dilution, mais rien à 1/100.

Chez la chatte, l'augmentation du pouvoir agglutinatif du sang fut plus sensible : le sérum du sang normal de la chatte

agglutinait légèrement les vibrions du choléra Angleur à 1/40; le sérum de la chatte qui avait pris du lait pendant environ 20 jours provoquait encore le même phénomène à raison de 1/100.

En présence de cette transmission, si faible qu'elle soit, du pouvoir agglutinant par le tube digestif, il faut rappeler les expériences de Ransom¹ qui a conclu à l'absence totale de résorption des toxines par l'intestin (toxine tétanique tout au moins). Il semblerait donc, si d'autres faits semblables aux miens sont établis, que les substances agglutinantes des humeurs sont mieux absorbées par le tube digestif que les toxines. Il y a lieu également de se demander si le pouvoir agglutinant, si considérable parfois, que Stern² vient de signaler pour le sang *normal* vis-à-vis du *bactérium coli*, agglutination beaucoup plus grande que vis-à-vis du *bacillus typhosus*, ne serait pas dû à une résorption des substances provenant des bacilles du côlon si abondants dans le tube digestif à l'état de santé.

Nous résumerons comme il suit les principales propriétés du sérum et des humeurs d'un animal fortement immunisé contre le choléra :

1^o Par l'immunisation anticholérique, on obtient, quand celle-ci est poussée assez loin, un sérum et un lait qui, à une certaine dilution, n'agglutinent plus que le microbe spécifique lui-même, à l'exclusion des microbes même d'espèces voisines.

Si les injections immunisantes sont continuées, on obtient un sérum qui, très dilué, n'agglutine plus que le microbe ayant servi aux inoculations, à l'exclusion des bacilles cholériques de même espèce mais d'autres provenances.

2^o Le sérum de certains animaux (chèvre), à l'état normal, agglutine, même assez dilué (1/50 dans les conditions d'expérience où je me suis placé), les microbes du choléra et les espèces pseudo-cholériques (vibrions de Metchnikoff, de Finkler et de Deneke). Si on soumet ces animaux à des injections immunisantes contre le choléra asiatique, le pouvoir agglutinant normal vis-à-vis des microbes pseudo-cholériques n'est en rien modifié.

1. RANSOM, Das Schicksal des Tetanustoxins nach seiner intestinalen Einverleibung in den Meerschweinchen-organismus, *Deutsche med. Wochenschrift*, 24 février 1898.

2. STERN, Typhusserum und Colibacillen, *Centralblatt für Bakteriologie*, mars 1898.

3° Le pouvoir agglutinant résultant des injections immunisantes se transmet au fœtus, mais faiblement. — Les substances agglutinantes paraissent réparties uniformément dans les organes du fœtus.

4° La propriété agglutinante, obtenue par les injections anticholériques, se transmet fortement à la sécrétion lactée, tandis que le pouvoir agglutinant du sérum normal se retrouve très faiblement dans le lait.

5° Le pouvoir agglutinant du lait peut être transmis, mais faiblement, par l'alimentation.

§ 2. AGGLUTINATION DU VIBRION CHOLÉRIQUE ET DES SPIRILLES DE
METCHNIKOFF, DE FINKLER ET DE DENEKE PAR LES SUBSTANCES CHI-
MIQUES PROPREMENT DITES.

M. Malvoz a signalé surtout comme bons agglutinants du *bacillus typhosus* la formaline (aldéhyde formique à 40 0/0 dans l'eau), le sublimé, la safranine, la vésuvine. Depuis la publication de son travail en juillet 1897, il a découvert d'autres substances agglutinantes : l'acide acétique à certaines dilutions, la fuchsine en solution saturée dans l'eau et bien filtrée (on n'emploie pas la solution alcoolique pour éviter l'action agglutinante de l'alcool).

Toutes mes expériences ont été faites de la même façon : on prenait des cultures fraîches, sur gélose inclinée, des vibrions à étudier; ces cultures avaient séjourné 24 heures à 37°. Une anse de la couche microbienne était délayée dans un centimètre cube d'eau distillée; on s'assurait que l'émulsion était parfaite, que les microbes étaient bien divisés et nullement agglomérés. A une anse de cette émulsion on ajoutait, sur porte-objet, en mélangeant convenablement, une anse du réactif à étudier. On ne peut, pour ces expériences, utiliser les cultures en bouillon ou en eau-peptone, car ces liquides, même stérilisés, forment souvent des coagulats albumineux avec les réactifs. Il est très important de se placer toujours dans les mêmes conditions, sinon les résultats ne sont nullement comparables. Ainsi, une culture âgée, par exemple, ne se comporte pas vis-à-vis de la formaline comme une culture jeune : les produits formés au sein d'une vieille culture modifient les conditions du phénomène. Nous avons successivement fait agir sur le choléra-Angleur, sur d'autres

microbes du choléra et sur les vibrions de Metchnikoff, de Finkler et de Deneke, les substances suivantes, à divers degrés de dilution dans l'eau distillée : la formaline, le sublimé, la safranine, la vésuvine, la fuchsine, le sulfate ammonique, l'acide acétique, l'alcool et la soude.

I. — Action de la formaline

1^o Anse pour anse d'émulsion et de formaline non diluée.

Choléra-Angleur donne instantanément de *petits* amas formés de bacilles très nettement agglutinés.

Vibrions de Metchnikoff, de Finkler et de Deneke donnent immédiatement de *gros* amas serrés.

Je me suis assuré, par des colorations ultérieures, que les amas, observés au microscope, dans tous les essais qui vont suivre, étaient bien formés de bacilles nettement agglutinés et non de simples coagulations albumineuses. Le mot amas désigne toujours des vibrions bien agglutinés.

2^o Anse pour anse d'émulsion et de formaline diluée à moitié.

Choléra-Angleur. — Les amas se forment plus lentement (2 à 3 minutes).

<i>Vibrions de Metchnikoff.</i>	} Agglutination également plus tardive; amas plus petits que ceux du vrai choléra.
— <i>de Finkler.</i>	
— <i>de Deneke.</i>	

3^o Anse pour anse d'émulsion et de formaline diluée au 1/4.

Choléra-Angleur. — Les amas sont plus rares et plus petits; ils ne se forment qu'après quelques minutes.

Vibrions de Metchnikoff. — Les amas sont plus rares et plus petits; ils ne se forment qu'après quelques minutes.

Vibrions de Finkler. — Agglutination plus faible que pour les 2 microbes précédents.

Vibrions de Deneke. — Pas d'agglutination.

II. — Action du Sublimé.

1^o Solution à 10 0/0 dans l'eau distillée.

<i>Choléra-Angleur.</i>	} Grands amas.
<i>Vibrions de Metchnikoff.</i>	

<i>Vibrions de Finkler.</i>	} Amas énormes (tout le champ du microscope).
<i>Vibrions de Deneke.</i>	

2^o Solution à 5 0/0 dans l'eau distillée.

<i>Choléra-Angleur.</i>	} Petits amas.
<i>Vibrions de Metchnikoff.</i>	

<i>Vibrions de Finkler.</i>	} Grands amas.
<i>Vibrions de Deneke.</i>	

3^o Solution à 2 0/0 dans l'eau distillée.

Résultats à peu près semblables.

4^o Solution à 1 0/00 dans l'eau distillée.

Choléra-Angleur, choléra-Guilvinec, choléra-Brest : pas d'amas.

Vibrions de Metchnikoff et de Finkler : petits amas de quelques individus seulement.

Vibrions de Deneke : grands amas formés de centaines de microbes agglutinés.

III. — Action de la Safranine.

1^o Anse pour anse d'émulsion et de safranine à 1 0/00.

Choléra-Angleur et les 3 vibrions : amas nombreux et volumineux se formant immédiatement.

2^o Anse pour anse d'émulsion et de safranine à 0,5 0/00.

Agglutination des 4 espèces microbiennes, mais la réaction n'est plus aussi rapide.

3^o Anse pour anse d'émulsion et de safranine à 0,25 0/00.

Choléra-Angleur, vibrions de Metchnikoff et de Finkler : pas d'agglutination. *Vibrions de Deneke* : petits amas, peu nombreux.

IV. — Action de la Vésuvine.

Anse pour anse d'émulsion et de vésuvine à 1/500.

Les 4 microbes donnent une agglutination très nette; les amas sont énormes.

On peut pousser la dilution de la vésuvine jusque 1/5000 et on a encore de l'agglutination pour les 4 microbes, avec des différences peu prononcées de l'un à l'autre.

V. — Action de la Fuchsine en solution aqueuse.

Agglutination très nette pour les 4 microbes, même avec des solutions de 1/5000.

VI. — Action du Sulfate ammonique.

Les 4 microbes agglutinent sensiblement de la même façon à raison d'une anse d'émulsion pour une anse de sulfate ammonique en solution saturée.

Pour peu que l'on dilue la solution de sulfate ammonique, ils finissent par ne plus agglutiner.

VII. — Action de l'acide acétique pur et dilué.

Une anse d'émulsion pour une anse d'acide acétique pur ou dilué de moitié : les 4 microbes n'agglutinent pas.

Avec de l'acide acétique dilué au 1/3, le *choléra-Angleur* agglutine seul légèrement.

L'acide acétique au 1/4 donne une agglutination nette pour le *choléra-Angleur*, légère pour les 3 autres microbes.

Au 1/5; agglutination nette pour *choléra-Angleur* et le *vibron de Deneke*; agglutination légère pour les deux autres microbes.

Au 1/10, au 1/20 et au 1/100, l'acide acétique donne une agglutination très nette avec les 4 microbes.

A 1/500, le phénomène de l'agglutination est moins net pour les 4 microbes.

A 1/4000, il ne se produit plus d'agglutination pour aucune des 4 espèces microbiennes.

VIII. — *Action de l'alcool à 95° et de la soude normale décime sur des émulsions de microbes dans l'eau calcaire et dans l'eau distillée.*

Ce que M. Malvoz¹ a démontré pour le bac. typhosus, à savoir l'entraînement des microbes dans des précipités formés au sein d'une émulsion de microbes, se vérifie également si l'on se sert d'émulsions de microbes cholériques ou des autres vibrions.

Si à une eau alimentaire comme celle de Liège, assez riche en bicarbonate calcique, on ajoute de la soude, on produit un précipité de carbonate calcique qui entraîne les vibrions primitivement émulsionnés dans cette eau : les amas ressemblent aux agglutinations provoquées par le sérum.

De même si l'on ajoute à une eau semblable de l'alcool à 95°, celui-ci amène également la précipitation de certains sels et en même temps celle des microbes que l'on a émulsionnés dans cette eau et qui se rassemblent en amas sous l'effet de cette précipitation.

Si l'on opère avec des émulsions en eau distillée, l'adjonction de ces deux substances ne provoque pas d'agglutination.

Il résulte de ces recherches que l'on peut provoquer le phénomène de l'agglutination au sein des émulsions de bacilles du choléra et des microbes de cette famille naturelle, non seulement au moyen des sérums spécifiques, mais également de certaines substances chimiques de composition relativement simple. On observe, d'un vibrion à l'autre, des différences parfois assez considérables dans la production du phénomène, pour certaines dilutions des réactifs. Ainsi, le sublimé à 1 0/00, la formaline au 1/4, la safranine à 0,25 0/00, n'agglutinent que certaines espèces à l'exclusion d'autres. Mais le phénomène n'a pas la sensibilité ni la netteté qui se révèlent quand on étudie l'action du sérum spécifique. Il est vrai que ce dernier doit aussi être convenablement dilué pour être utilisé pour le diagnostic; mais, à cette dilution déterminée, l'agglutination du bacille spécifique est très nette et *aucun autre microbe ne la subit*. Il n'en est pas de même pour les agglutinants physico-chimiques vis-à-vis du choléra et des espèces de ce groupe. Nous ne sommes pas en possession d'une substance chimique qui, à une dose déterminée,

1. MALVOZ. *Loc. cit. Annales Pasteur*, 1897.

agglutinerait exclusivement le vibron cholérique et pourrait servir ainsi, à elle seule, au diagnostic précis de ce microbe.

Néanmoins, je crois que l'on peut, au besoin, utiliser les données précédentes dans les recherches analytiques, comme je l'ai proposé, avec M. Lambotte, dans les analyses concernant le bacille typhique.

En présence de colonies présentant les caractères du choléra, on fait des cultures sur gélose quel'on laisse 24 heures à 37°; on obtient rapidement des émulsions et, à une anse d'émulsion, on ajoute une anse de sublimé à 1 0/00, par exemple. Tous les échantillons qui fourniraient de grands amas seraient considérés comme n'appartenant pas au choléra, et éliminés pour les recherches ultérieures; mais les microbes n'ayant pas subi l'agglutination seraient conservés pour les recherches. Ce moyen d'investigation rendra des services quand on ne sera pas en possession d'animaux fortement immunisés contre le choléra : ce qui est fréquent. En dehors de leur intérêt théorique qui permet de creuser davantage le phénomène mystérieux de l'agglutination, nos recherches peuvent aussi avoir une utilité pratique. Le meilleur moyen de déterminer la nature cholérique d'un microbe donné par les caractères tirés du phénomène de l'agglutination, sera toujours l'emploi d'un sérum convenable. Mais à défaut d'un tel sérum, certains agglutinants chimiques peuvent être utilisés pour la séparation et un premier triage des cultures.

En tout cas, il conviendra dans l'avenir, pour la caractérisation des espèces microbiennes, de noter, à côté des autres signes classiques, les particularités de l'agglutination chimique.

Institut d'anatomie pathologique et de bactériologie de l'Université de Liège. Août 1898.

ERRATUM. Dans l'article de M. Besredka, les premières lignes de la page 609 ont *sauté* sous presse. Les voici rétablies :

Dans ses nombreux mémoires et ceux de ses élèves, il cherchait à déterminer la nature chimique de cette substance qui confère au sérum sa propriété microbicide, substance qu'il a désignée sous le...

TABLE DES MATIÈRES

Les microbes des nodosités des légumineuses, par M. MAZÉ	4
Production de la toxine diphtérique, par M. le D ^r MARTIN.	26
Contribution à l'étude de la fermentation lactique, par M. H. POTTEVIN	49
Fermentation lactique des corps sucrés, par M. PÉRÉ. . . .	63
Rapport au sujet du monopole de l'alcool, par M. DUCLAUX. . . .	73
Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines, par M. E. METCHNIKOFF.	81
Recherches sur les propriétés antitétaniques des centres nerveux de l'animal sain, par M. MARIE	94
Lois générales de l'action des diastases, par M. DUCLAUX. .	96
Les microbes des nodosités des légumineuses, par M. MAZÉ (3 ^e mémoire)	128
Que savons-nous de l'origine des <i>saccharomyces</i> ? par MM. KLOCKER et SCHIONNING.	156
Recherches sur la substance agglutinée, par M. CH. NICOLLE.	161
La destruction des microbes dans le tissu sous-cutané des animaux hypervaccinés, par M. SALIMBENI.	192
Action de la toxine diphtérique sur les muqueuses, par MM. MORAX et ELMASSIAN.	210
Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos, par MM. ROUX et BORREL	225
Le microbe de la péripneumonie, par MM. NOCARD et ROUX.	240
Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines	

(3 ^e mémoire : toxine tétanique et leucocytes), par M. E. METCHNIKOFF	263
Nouvelles recherches sur le mode de destruction des vibrions dans l'organisme, par M. J. CANTACUZÈNE. . . .	273
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1897, par M. H. POTTEVIN	301
De la leucocytose dans la diphtérie, par M. le D ^r BESREDKA. . .	305
Sur le mécanisme de l'immunisation contre les venins, par M. le D ^r A. CALMETTE	343
Premières expériences sur l'emploi du sérum préventif et curatif de la fièvre jaune, par M. le D ^r J. SANARELLI . .	348
Des nucléines, par M. le D ^r NOLF	361
Étude expérimentale des altérations pathologiques pro- duites par les venins des serpents venimeux et des scorpions, par M. le D ^r NOWAK	369
Recherches sur la production biochimique du sorbose, par M. G. BERTRAND	385
Sur la maturation des fromages, par M. SCHIROKICH. . . .	400
Note sur une petite épidémie de fièvre typhoïde d'origine hydrique, par M. le D ^r G. SCHNEIDER	402
Statistique de l'Institut Pasteur hellénique d'Athènes, par M. le D ^r PAMPOUKIS.	404
Sur les proenzymes, par M. DUCLAUX.	406
Recherches sur l'action sporicide du sérum, par M. le D ^r JOS. HALBAN.	417
Contribution à l'étude de l'immunité vis-à-vis du <i>bacillus</i> <i>subtilis</i> , par M. le D ^r PODBELSKY	427
Du pouvoir pénétrant de l'aldéhyde formique, par M. le D ^r DE RECHTER	447
Sur la conservation du bacille typhique dans le cidre, par M. le D ^r BODIN.	458
Sur l'immunité naturelle des organismes monocellulaires contre les toxines, par M. le D ^r GENGOU	465
Des albumines, par M. le D ^r P. NOLF.	471
Sur le mode d'action du sérum préventif contre le rouget des porcs, par M. FÉLIX MESNIL	481

Contribution à l'étude de la plasmolyse chez les bactéries, par MM. PODWYSSOTSKY et B. TARANOUKHINE.	501
Contribution à l'étude du venin des serpents, par M. le D ^r WEHRMANN	510
Contribution à l'étude de l'azote contenu dans le vin, par M. J. LABORDE.	517
L'Institut Pasteur de Rio-de-Janeiro. Statistique décen- nale, par M. le D ^r FERREIRA DOS SANTOS	541
Les albuminoïdes, par M. P. NOLF.	547
Sur les relations qui existent entre la tuberculose humaine et la tuberculose aviaire, par M. NOCARD.	561
Une épidémie de paralysie ascendante chez les aliénés, rappelant le Bériberi, par MM. CHANTEMESSE et RAMOND.	574
Note sur la bactériologie de la verruga du Pérou, par M. CH. NICOLLE	591
Le bacille de la diphtérie pullule-t-il dans les organes ? par M. METIN	596
L'épidémie de peste de Djeddah en 1898, par M. NOURY- BEY	604
Du pouvoir bactéricide des leucocytes, par M. BESREDKA.	607
La Propagation de la peste, par M. P. SIMOND	625
Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum, par M. J. BORDET	688
Influence favorable du chauffage du sérum antidiphté- rique sur les accidents post-sérothérapiques, par M. C. H. H. SPRONCK	696
Préparation de la toxine diphtérique : suppression de l'emploi de la viande, par M. C. H. H. SPRONCK	701
La propagation de la peste, par M. le D ^r HANKIN	705
Sur la reproduction de la substance antitoxique après de fortes saignées, par MM. C. SALOMONSEN et T. MADSEN	763
Statistique de l'Institut antirabique municipal de Turin et notes de laboratoire, par M. le D ^r FR. ABBA	774
Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes, par M. VINCENT.	785
Étude cytologique et cycle évolutif de la coccidie de la seiche, par M. SIEDLECKI	799

Études sur l'immunité vaccinale, par MM. BÉCLÈRE, CHAMBON et MÉNARD	837
Note sur la contagiosité de la peste bovine au porc, par MM. CARRÉ et FRAIMBAULT.	848
Étude sur l'agglutination comparée du vibrion cholérique et des microbes voisins par le sérum spécifique et par les substances chimiques, par M. BOSSAERT.	857
Table des matières	873

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

TRAVAUX ORIGINAUX

ABBA.	Institut antirabique municipal de Turin. .	774
BÉCLÈRE, CHAMBON et MÉNARD.	Immunité vaccinale.	837
BERTRAND (G.).	Production biochimique du sorbose. . . .	385
BESREDKA.	Leucocytose dans la diphtérie	305
BODIN	Bacille typhique dans le cidre.	458
BORDET (J.)	Agglutination et dissolution des globules rouges	688
BORREL.	Voir ROUX.	
BOSSAERT	Agglutination des microbes.	857
CALMETTE	Immunisation contre les venins.	343
CANTACUZÈNE.	Destruction des vibrions dans l'organisme. .	273
CARRÉ et FRAIMBAULT. . .	Peste bovine chez le porc.	848
CHANTEMESSE et RAMOND. .	Paralyse ascendante chez les aliénés . . .	574
CHAMBON.	Voir BÉCLÈRE.	
DUCLAUX.	Lois générales de l'action des diastases. .	96
ELMASSIAN	Voir MORAX.	
FERREIRA DOS SANTOS. . .	Institut Pasteur de Rio-Janeiro	541
FRAIMBAULT	Voir CARRÉ.	
GENGOU	Immunité des organismes cellulaires. . . .	465
HALBAN	Action sporicide du sérum	417
HANKIN.	Propagation de la peste	705
LABORDE.	Azote contenu dans le vin	517
MADSEN	Voir SALOMONSEN.	
MARIE	Propriétés antitétaniques des centres ner- veux	91
MARTIN.	Production de la toxine diphtérique. . . .	26
MAZÉ.	Microbes des nodosités des légumineuses .	1
—	Même sujet	128
MÉNARD	Voir BÉCLÈRE.	
METCHNIKOFF.	Influence de l'organisme sur les toxines .	81
—	Même sujet (3 ^e mém.)	263

MESNIL	Sérum préventif contre le rouget.	481
MÉTIN	Bacille de la diphtérie dans les organes	596
MORAX et ELMASSIAN.	Toxine diphtérique sur les muqueuses.	210
NICOLLE (CH.)	Recherches sur la substance agglutinée	161
—	Bactériologie de la verruga du Pérou	591
NOCARD.	Tuberculose humaine et tuberculose aviaire.	561
— et ROUX	Microbe de la péripneumonie	240
NOURY-BEY.	Épidémie de peste à Djeddah	604
NOWAK	Altérations pathologiques produites par les venins.	369
PAMPOUKIS	Institut Pasteur hellénique d'Athènes	404
PÉRÉ.	Fermentation lactique des corps sucrés.	63
PODBELSKY	Immunité vis-à-vis du <i>bacillus subtilis</i>	427
PODWYSSOTSKY et TARA- NOUKHINE	Plasmolyse chez les bactéries.	501
POTTEVIN.	Fermentation lactique.	49
—	Vaccinations à l'Institut Pasteur en 1897.	301
RAMOND	Voir CHANTEMESSE.	
RECHTER (DE)	Pouvoir pénétrant du formol.	447
ROUX et BORREL.	Tétanos cérébral	225
—	Voir NOCARD.	
SALIMBENI.	Destruction des microbes sous la peau des animaux hypervaccinés	192
SALOMONSEN et MADSEN	Reproduction de l'antitoxine	763
SANARELLI	Sérum préventif et curatif de la fièvre jaune.	348
SCHIROKICH.	Maturation des fromages.	400
SCHNEIDER	Fièvre typhoïde d'origine hydrique	402
SIEDLECKI	Coccidie de la seiche	799
SIMOND.	Propagation de la peste.	625
SPRONCK	Chauffage du sérum antidiphtérique.	696
—	Préparation de la toxine diphtérique	701
TARANOUKHINE.	Voir PODWYSSOTSKY.	
VINCENT	Microbes saprophytes et pathogènes.	785
WEHRMANN.	Venin des serpents	510

REVUES ET ANALYSES

BESREDKA	Pouvoir bactéricide des leucocytes	607
DUCLAUX.	Rapport au sujet du monopole de l'alcool.	73
—	Sur l'origine des <i>saccharomyces</i>	456
—	Sur les proenzymes	407
NOLF (P.)	Sur les nucléines	361
—	Sur les albumines.	474
—	Sur les albuminoïdes	547
BESREDKA	Pouvoir bactéricide des leucocytes.	607

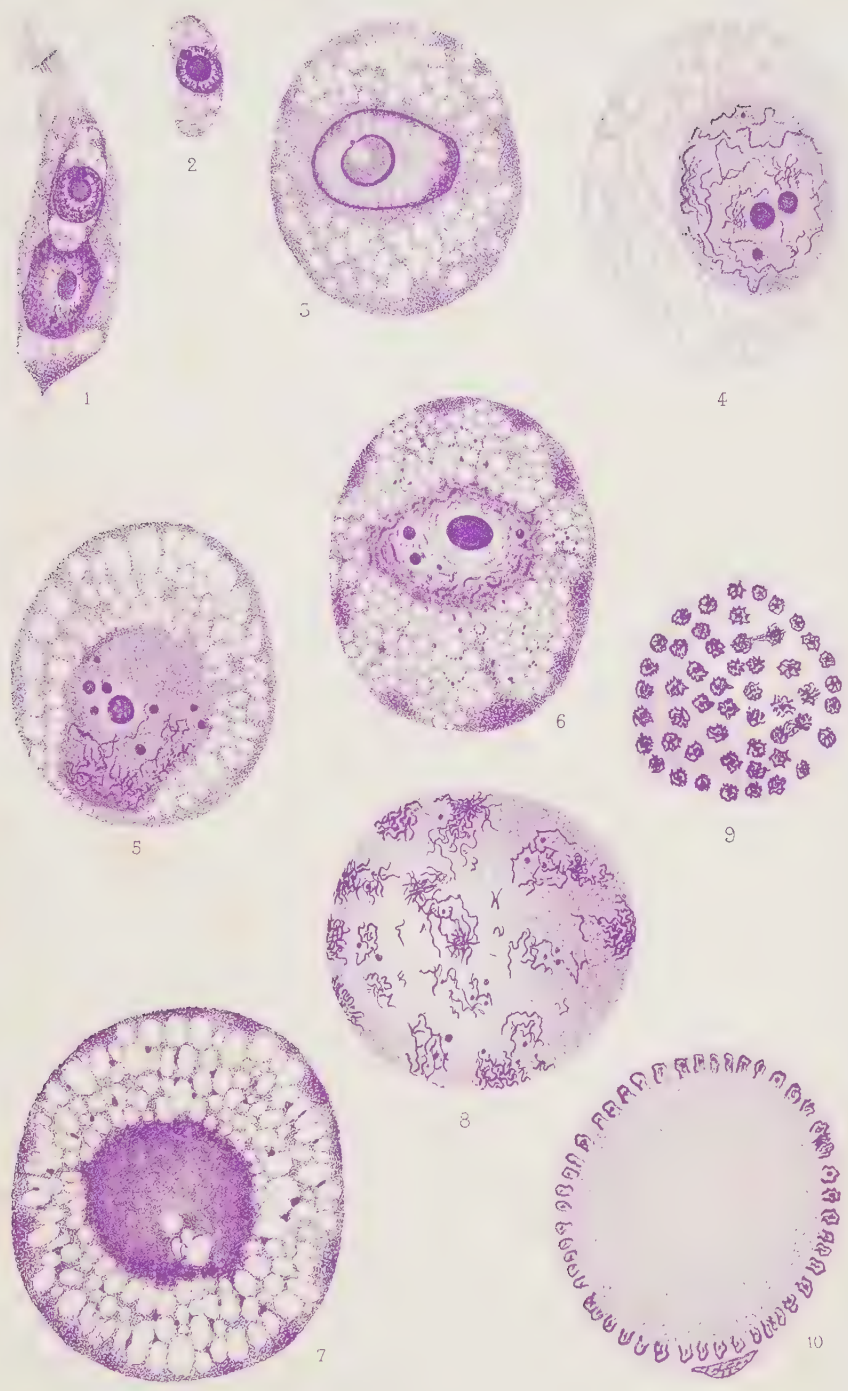
PLANCHES HORS TEXTE

Planches I et II	Mémoire de MM. MAZÉ.	128
Planches III et IV	— NOWAK.	369
Planche V	— PODWYSSOTSKY.	501
Planche VI.	— CHANTEMESSE.	574
Planches VII, VIII et IX.	— SIEDLECKI.	799

Le Gérant : G. MASSON.

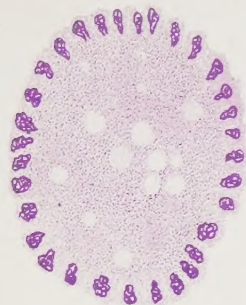
Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.



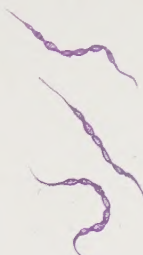


M.Siedlecki, del.

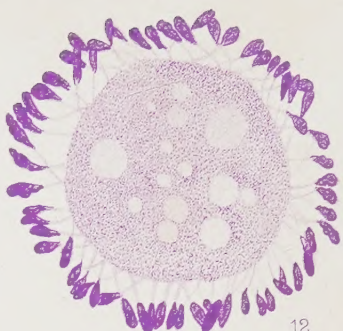
V.Roussel, lith.



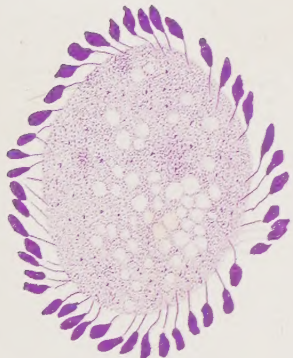
11



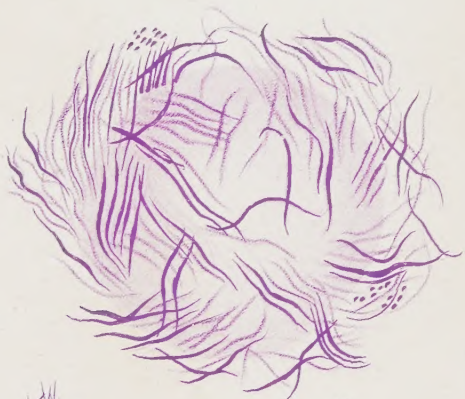
16



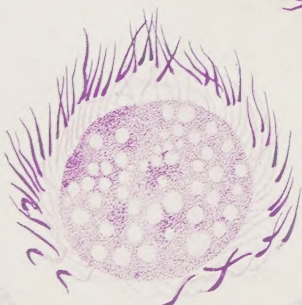
12



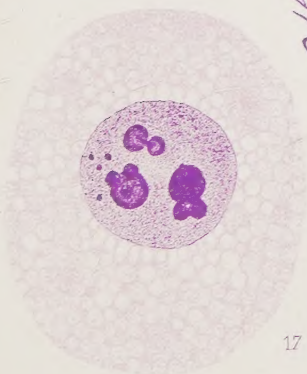
13



15



14



17

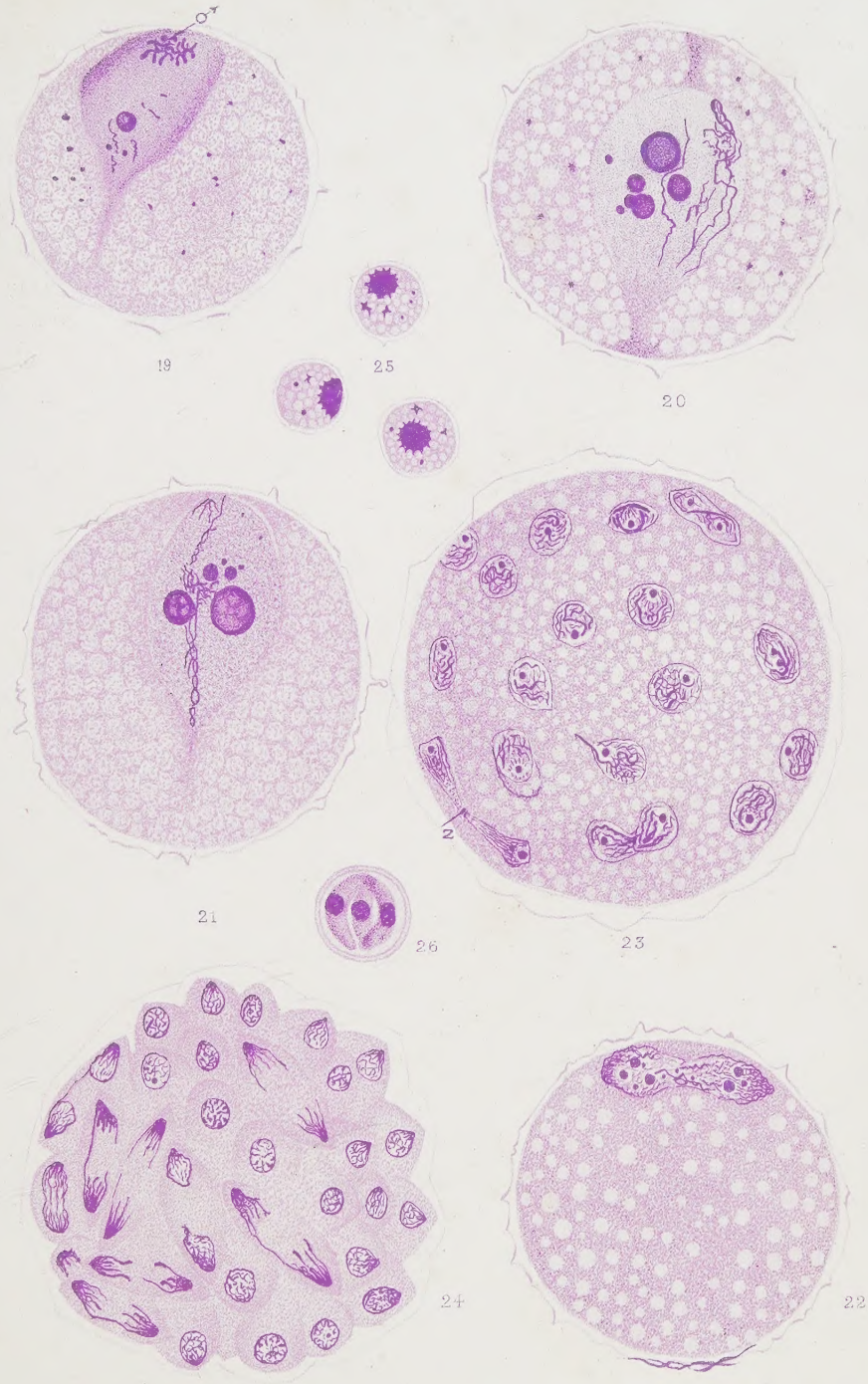


18

M. Siedlecki, del.

V. Roussel, lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.



M. Siedlecki, del.

V. Roussel, lith.

